



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**MARCADORES PREDICTIVOS DE AGRESIVIDAD Y
SUPERVIVENCIA EN TUMORES NEUROENDOCRINOS
GASTROENTEROPANCREÁTICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Antonio Sampedro Núñez

Directora

Prof. Dra. Mónica Marazuela Azpíroz

Madrid 2017

“...Sabía que se tomaba tanto tiempo para no decir nunca nada que no fuera verdad. Pues en su opinión, todas las desgracias del mundo nacían de las muchas mentiras, las dichas a propósito, pero también las involuntarias, causadas por la prisa e imprecisión...”

Michel Ende

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis Mónica Marazuela Azpíroz. Su vocación médica, docente e investigadora ha sido un gran ejemplo durante mi formación como médico especialista de Endocrinología y Nutrición. Me ha enseñado valores fundamentales en la investigación y estoy agradecido por todas las oportunidades que me ha brindado.

A todo el servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario de La Princesa incluyendo médicos adjuntos, residentes, enfermeras, educadores y personal administrativo, y en especial a la doctora Ana Ramos Leví, por su colaboración durante mi carrera de investigación.

A todos los miembros de los Servicios de Anatomía Patológica y Cirugía general del Hospital Universitario de La Princesa, especialmente a la Dra. Elena Martín y la Dra. Magdalena Adrados por su constante apoyo en esta Tesis Doctoral.

A todos los miembros del Laboratorio de Endocrinología Molecular del Instituto de Investigación Princesa, especialmente a Ana Serrano Somavilla y Rebeca Martínez Hernández por su confianza y apoyo en todo momento.

Al Grupo “Hormonas y Cáncer” del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, especialmente a los Dres. Justo Pastor Castaño, Raúl Luque y Manuel Gahete que han contribuido en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A los pacientes con tumores neuroendocrinos que siempre han prestado su apoyo para la investigación en esta patología. Ellos son los soldados desconocidos que participan en la mayoría de las investigaciones biomédicas.

A mis padres Rosa y Miguel, que me han inspirado durante toda la vida. A mi hermana Sandra Elena que ha sido una compañera incondicional. A mi abuelo Luis Enrique que participo en toda mi formación como persona.

A Cesar que ha sido como otro hermano para mí desde la infancia y a todos los amigos que se van incorporando en el camino.

A Gail, la heroína con la que vivo todas mis aventuras, incluida esta tesis doctoral.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH:	Hormona adrenocorticotropa
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ang:	Angiopietinas
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ASS:	Análogos sintéticos de la somatostatina
CgA:	Cromogranina
CNE:	Carcinoma neuroendocrino
CORT:	Cortistatina
DE:	Desviación estándar
EEM:	Error estándar de la media
ELISA:	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ENETS:	Sociedad Europea de Tumores Neuroendocrinos
G:	Grado tumoral basado en tasa de proliferación
GH:	Hormona de crecimiento
GHSR:	Receptores de ghrelina
GOAT:	Ghrelina-O-acil-transferasa
IC:	Intervalo de confianza
IF:	Inmunofluorescencia
IHQ:	Inmunohistoquímica
IHS:	Índice de puntuación inmunohistoquímica
mTOR:	Diana de la rapamicina en mamíferos
NC:	No calculable (categoría de referencia o mediana no alcanzada)
ND:	No disponible

NNE:	Neoplasia neuroendocrina
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PRL:	Prolactina
qPCR:	PCR cuantitativa a tiempo real
Ref.:	Categoría de referencia
SNC:	Sistema nervioso central
sst:	Receptores de somatostatina
SST:	Somatostatina
sst5TMD4:	Variantes de splicing del sst5 con 4 dominios transmembrana
sst5TMD5:	Variantes de splicing del sst5 con 5 dominios transmembrana
TGI:	Tracto gastrointestinal
Tie-2:	Familia de receptores de tirosina quinasa
TNE:	Tumores neuroendocrinos
TNE-GEP:	Tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos
TNM:	Sistema TNM de estadificación del cáncer
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Tumores Neuroendocrinos.....	15
1.1 Definición.....	15
1.2 Epidemiología.....	15
1.3 Etiología.....	16
1.4 Clasificación	16
1.5 Factores predictivos	18
1.6 Tratamiento	20
2. Regulación del eje neuroendocrino: papel de somatostatina, cortistatina y ghrelina.	22
2.1 Somatostatina, cortistatina, ghrelina y sus receptores como factores reguladores metabólicos	23
2.2 Sistema SST/CORT y sus receptores	23
2.3 Sistema ghrelina y su receptor	29
3. Papel del sistema SST/CORT y ghrelina en la fisiopatología del cáncer	32
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Registro de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa .	41
2. Cohorte seleccionada para estudio molecular	41
2.1 Población.....	41

2.2 Muestras.....	42
3. Cultivo de células	43
4. Aislamiento de ARN y retrotranscripción	43
5. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	44
6. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	45
7. Transfección estable del receptor truncado sst5TMD4 y péptido In1-ghrelina	47
8. Ensayo de proliferación de azul Alamar.....	48
9. Ensayo de capacidad de migración	48
10. Ensayo de secreción in vitro y expresión de marcadores angiogénicos.....	49
11. Análisis estadístico.....	50
RESULTADOS	53
1. Análisis descriptivo de cohorte de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa	55
2. Análisis de supervivencia global y factores pronósticos de cohorte de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa	57
2.1 Análisis univariante.....	57
2.2 Análisis multivariante.....	60
2.3 Comprobación de supuestos en análisis multivariante de supervivencia global y factores pronósticos.....	62
2.4 Construcción de una tabla pronostica de razones de riesgo de cohorte de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa.....	65
3. Análisis descriptivo de cohorte seleccionada para estudio molecular	66
4. Expresión de los sistemas reguladores SST/CORT en los TNE-GEP y su relación con marcadores angiogénicos como marcadores de malignidad	68

4.1 Los receptores SST y las variantes truncadas están sobreexpresados en TNE-GEP	68
4.2 sst5TMD4 se asocia a características malignidad en TNE-GEP y en líneas celulares transfectadas.....	73
4.3 La expresión de receptores truncados se correlaciona con la expresión de marcadores angiogénicos en pacientes con TNE-GEP	77
5. Expresión del sistema ghrelina en los TNE-GEP como marcadores de malignidad	84
5.1 Los componentes del sistema de la ghrelina se sobreexpresan en TNE-GEP84	
5.2 La expresión de In1-ghrelina, GOAT y GHSR1b está asociada a peor pronóstico	89
5.3 La expresión de las variantes de splicing del sistema de ghrelina, especialmente In1-ghrelina, se asocia con características de malignidad en pacientes con TNE-GEP	92
5.4 La sobreexpresión de In1-ghrelina se asocia con características de agresividad en células TNE humanas	95
DISCUSIÓN.....	99
1. Impacto pronóstico en la supervivencia global de las categorías G1/G2/G3 de la OMS 2010, enfermedad metastásica y edad en la Cohorte de Tumores Neuroendocrinos del Hospital Universitario de La Princesa (1995-2016)	101
2. Expresión de los sistemas reguladores SST/CORT en los TNE-GEP y su relación con marcadores angiogénicos como marcadores de malignidad	105
3. Expresión de los sistemas ghrelina en los TNE-GEP como marcadores de malignidad.....	109
CONCLUSIONES	115

BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXO	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación OMS 2010 de TNE-GEP..	18
Tabla 2. Cebadores utilizados en los distintos estudios	45
Tabla 3. Características de la cohorte de TNE del Hospital Universitario de La Princesa	56
Tabla 4. Factores pronósticos de supervivencia global.....	58
Tabla 5. Modelo máximo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global	60
Tabla 6. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global seleccionado bajo método de todas las ecuaciones posibles.....	61
Tabla 7. Tabla pronostica de razones de riesgo.....	65
Tabla 8. Características clínicas prequirúrgicas de los 26 pacientes con TNE-GEP ...	67
Tabla 9. Muestras de tumor primario (%) en las que se detectaron receptores de somatostatina.	69
Tabla 10. Porcentaje (%) de los tejidos normales de control y tejidos de TNE que expresan los componentes del sistema de ghrelina y el número medio de copias de ARNm de cada componente \pm EEM	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de tumores neuroendocrino en el mundo occidental	16
Figura 2. Regulación central (hipotálamo) y periférica (tracto gastrointestinal). Papel de somatostatina, cortistatina y ghrelina.	23
Figura 3. Esquema de la secuencia de aminoácidos de SST-14 y SST-28	24
Figura 4. Esquema de la secuencia de aminoácidos de CORT-14 y CORT-29.....	25
Figura 5. Representación esquemática de los genes SST/CORT	26

Figura 6. Representación de los receptores sst1-sst5 y variantes truncadas.	27
Figura 7. Proceso de acilación de la ghrelina.....	29
Figura 8. Representación esquemática del gen de la ghrelina.....	30
Figura 9. Supervivencia global de los pacientes con TNE por grado tumoral	58
Figura 10. Supervivencia global de los pacientes con TNE según estadio	59
Figura 11. Supervivencia global de los pacientes según metástasis	59
Figura 12. Comprobación gráfica de supuesto de proporcionalidad	63
Figura 13. Comprobación gráfica de residuales de Martingale	64
Figura 14. Expresión de receptores de somatostatina en TNE-GEP y tejidos adyacentes no tumorales.....	69
Figura 15. Expresión de sst5TMD4 en tejido no tumoral adyacente en comparación con tejidos normales.....	70
Figura 16. Tinción inmunohistoquímica de 3 muestras de páncreas normal (sano) para cromogranina A (CgA) y receptor truncado sst5TMD4.....	71
Figura 17. Expresión de SST y CORT en TNE-GEP y tejido adyacente no tumoral....	72
Figura 18. La expresión de sst5TMD4 se asocia a una mayor malignidad en pacientes con TNE-GEP	74
Figura 19. La presencia de sst5TMD4 se asocia a características de malignidad en las líneas celulares de TNE.....	76
Figura 20. Expresión de marcadores angiogénicos en TNE-GEP y tejido adyacente no tumoral.....	78
Figura 21. Expresión de sst5TMD4 y co-localización con marcadores angiogénicos en TNE-GEP	79
Figura 22. Heat-Map para correlaciones entre la expresión de los sistemas de SST y la angiogénesis (Rho de Spearman).....	82
Figura 23. La secreción de VEGF y factores pro-angiogénicos en líneas celulares transfectadas de forma estable con sst5TMD4	83
Figura 24. Expresión de los componentes del sistema de ghrelina en TNE-GEP	85

Figura 25. Correlación de los componentes del sistema de ghrelina en TNE-GEP	87
Figura 26. Expresión de los componentes del sistema de ghrelina en TNE-GEP de acuerdo a muestra primaria o metastásica.....	88
Figura 27. Niveles de expresión de ARNm de los componentes del sistema de ghrelina determinados por qPCR en las muestras tumorales en función del resultado del paciente (remisión completa, enfermedad estable o progresión del tumor).....	91
Figura 28. Expresión de los componentes del sistema de ghrelina en los tejidos primarios de TNE con o sin metástasis	94
Figura 29. Efectos de la sobreexpresión de In1-ghrelina en líneas celulares derivadas de TNE.....	96
Figura 30. Expresión de los genes reguladores de la apoptosis en las líneas celulares de TNE.....	97

RESUMEN

Los tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (TNE-GEP) son un grupo de neoplasias heterogéneas con escasos elementos moleculares comunes que pueden ayudar a su diagnóstico y tratamiento, lo cual conlleva una morbilidad y mortalidad elevadas. Aunque estos tumores son considerados clásicamente como raros, su prevalencia ha ido aumentando y en la actualidad son la segunda causa de los cánceres gastrointestinales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2010 una valiosa herramienta de estratificación basada en 3 subgrupos pronósticos que clasifican los tumores de acuerdo al grado de proliferación tumoral. Esta clasificación ha conllevado el que exista gran heterogeneidad entre los subgrupos, ya que no solo la proliferación tumoral, sino diversos factores clínicos e histológicos pueden tener un importante papel como predictores de fenotipo de enfermedad y supervivencia de estos pacientes. Dentro de estos factores se incluyen, entre otros, factores clínicos como la edad del paciente o la presencia de enfermedad metastásica y factores histológicos como la localización del tumor primario, y la morfología del tumor. Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de la influencia de diversos marcadores clínico-moleculares en el fenotipo de enfermedad y supervivencia de los TNE-GEP en nuestro grupo de pacientes.

Un elemento clave en la evolución de los TNE GEP es su vínculo con señales endocrino-metabólicas tanto de origen sistémico como local, que controlan el desarrollo y la regulación (pato)fisiológica de las células neuroendocrinas. Concretamente, el crecimiento y secreción hormonal de las células neuroendocrinas está regulada por factores inhibidores, como la somatostatina (SST) y la cortistatina (CORT), y por factores estimuladores como la ghrelina. En concreto, los sistemas SST/CORT y ghrelina podrían tener un papel en la regulación de la proliferación en patología tumoral incluyendo los TNE.

Otro objetivo de esta Tesis ha sido aportar información novedosa y original acerca del sistema regulador SST/CORT y su papel en los TNE-GEP. Así, hemos observado que la expresión de los receptores de somatostatina (sst) 1, sst2, sst3, y las variantes de splicing del sst5 (sst5TMD4 y sst5TMD5) fueron significativamente mayores en los tejidos tumorales en comparación con su tejido adyacente no tumoral. Adicionalmente, las metástasis de ganglios linfáticos expresaron niveles más altos de sst5TMD4 que el tumor primario correspondiente. Asimismo, sst5TMD4 fue significativamente mayor en los tejidos tumorales intestinales de pacientes que presentaban enfermedad residual en comparación con aquellos curados. Un hallazgo muy interesante fue la correlación entre varios de los marcadores angiogénicos de la familia de las angiopoyetinas y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con la variante de splicing sst5TMD4, lo cual apoyaría una posible relación fisiopatológica entre las variantes de splicing del sistema SST y la angiogénesis a nivel de estos tumores.

Por último, hemos estudiado el sistema de la ghrelina, específicamente el papel de la variante de splicing In1-ghrelina en los TNE. En este sentido, diversos elementos de esta vía incluidos la In1-ghrelina, los receptores (GHSR1a y GHSR1b) y la enzima modificadora [Ghrelina-O-acil-transferasa (GOAT)] se encontraron elevados en TNE-GEP en comparación con los tejidos normales adyacentes. Además, se demostró una correlación entre los niveles de expresión de los distintos elementos de esta vía In1-ghrelina, GOAT y GHSR1b en TNE, pero no en tejidos normales. Asimismo, los niveles de In1-ghrelina fueron más elevados en pacientes con enfermedad progresiva comparados con pacientes con enfermedad estable o curada. Estos hallazgos se confirmaron in vitro, demostrando que la adición de In1-ghrelina fuera capaz de aumentar la agresividad (proliferación y migración) de células neuroendocrinas tumorales.

En definitiva, los resultados de esta Tesis Doctoral apoyan el uso del grado tumoral para la planificación de tratamiento de los pacientes con TNE apoyado en otros datos clínicos y moleculares. Asimismo, los datos obtenidos sugieren fuertemente una posible implicación del sistema de SST, del sistema ghrelina y de sus variantes de splicing en la patogénesis y/o evolución de los TNE-GEP, y justifican nuevos estudios para confirmar el posible papel de estos sistemas como biomarcadores moleculares con valor diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico.

SUMMARY

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NET) are a heterogeneous group of neoplasms with a limited number of common molecular elements that could guide in their diagnosis and treatment. This difficulty in the diagnosis delays treatment and can lead to high morbidity and mortality. Although these tumors are generally considered rare, there has been an increase in their prevalence, and they are currently considered the second most frequent gastrointestinal cancers, only surpassed by colorectal neoplasias.

The World Health Organization (WHO) published in 2010 a valuable stratification tool based on 3 prognostic subgroups that classify tumors according exclusively to the tumor proliferation rate. This classification has led to substantial heterogeneity within these subgroups, since not only tumor proliferation, but other clinical and histological factors may play an important role as predictors of disease phenotype and patient's survival. These factors include, among others, clinical variables, such as the patient's age or the presence of metastatic disease; and histological factors, such as the primary tumor location and morphology. In this regard, one of the objectives of this Doctoral Research has been to deepen in the knowledge of the influence of several clinical and molecular markers on the disease phenotype and survival of GEP-NETs in our cohort of patients.

In addition, another key element in the onset and progression of GEP-NETs is their link with endocrine-metabolic signals, of both systemic and local origin, that control the development and pathophysiological regulation of neuroendocrine cells. Specifically, the growth and hormonal secretion of neuroendocrine cells is regulated by inhibitory factors, such as somatostatin (SST) and cortistatin (CORT), and by stimulatory factors such as ghrelin. Specifically, the SST/CORT and ghrelin systems could play a regulatory role in the pathologic tumor proliferation of NETs.

SUMMARY

Thus, another objective of this doctoral research has been to provide novel and original information about the SST/CORT regulatory system and its role in GEP-NET. In this case, we observed that the expression of somatostatin (sst)1, sst2, sst3, and sst5 splicing variants (sst5TMD4 and sst5TMD5) were significantly higher in tumor tissues compared to their adjacent non-tumor tissue. Additionally, lymph-node metastases expressed higher levels of sst5TMD4 than the corresponding primary tumor tissue. sst5TMD4 was also significantly higher in the intestinal tumor tissues from patients with residual disease compared to those cured. Interestingly, we found a correlation between several angiogenic markers of the angiopoietin family and the vascular endothelial growth factor (VEGF) with the sst5TMD4 splicing variant, which would support a possible pathophysiological relationship between the splicing variants of the SST system and angiogenesis of these tumors.

Finally, we have studied the ghrelin system, specifically the role of the In1-ghrelin splicing variant in NETs. In this context, several elements of this pathway, including In1-ghrelin, its receptors (GHSR1a and GHSR1b) and the modifying enzyme [Ghrelin-O-acyltransferase (GOAT)], were found to be overexpressed in GEP-NET tumor tissues compared to their adjacent non-tumor tissue. Moreover, In1-ghrelin, GOAT, and GHSR1b expression levels were positively correlated within the tumor, but not within the normal/adjacent samples. In1-ghrelin levels were also higher in patients with progressive vs. stable/cured disease. These findings were confirmed in vitro, proving that the addition of In1-ghrelin increased aggressiveness (e.g. proliferation/migration) of NET cells.

In conclusion, the results of this Doctoral Research support the use of tumor grade in the evaluation of prognosis and therapy in NET patients. Data obtained strongly suggest a possible implication of the SST system, the ghrelin system and its spliced variants in the pathogenesis and/or outcome of GEP-NETs, and warrant further studies

to confirm their possible role as molecular biomarkers with diagnostic, prognostic and/or therapeutic value.

INTRODUCCIÓN

1. Tumores Neuroendocrinos.

1.1 Definición

Los tumores neuroendocrinos (TNE) son un grupo heterogéneo de neoplasias epiteliales con diferenciación predominantemente neuroendocrina. Se originan de células neuroendocrinas (células muy especializadas con características neurales y endocrinas) que de acuerdo a la secreción de hormonas específicas regulan diferentes funciones [1]. Debido a la amplia distribución corporal de estas células, pueden originarse en casi cualquier órgano. Si bien algunas características clínicas y patológicas de estos tumores son únicas/específicas para la localización de origen, otras características son compartidas, independientemente de su localización.

1.2 Epidemiología

Los tumores neuroendocrinos (TNE) del sistema digestivo comprenden los tumores que surgen en el tubo gastrointestinal y el páncreas (TNE-GEP). La incidencia ha ido en aumento con el tiempo. Datos actuales reportan una incidencia de 5.1/100000 y una prevalencia de 35/100000 en EEUU [2] (Figura 1). La razón exacta de este aumento no se conoce, pero podría estar en relación con una mayor conciencia de esta enfermedad por parte de los médicos, así como un mejor diagnóstico y tratamiento.

Aunque estos TNE-GEP son aun considerados relativamente raros, se ha reportado que presentan incidencia similar al cáncer de testículo, cáncer de cuello uterino, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin y algunos cánceres de sistema nervioso central [3]. Además, la prevalencia de TNE-GEP es mayor que la de la mayoría de los cánceres gastrointestinales, incluyendo páncreas, estomago, esófago y carcinomas hepatobiliar, siendo sólo superada por las neoplasias colorrectales [2]. De esta manera resulta imperativo ampliar el conocimiento en este grupo de tumores.

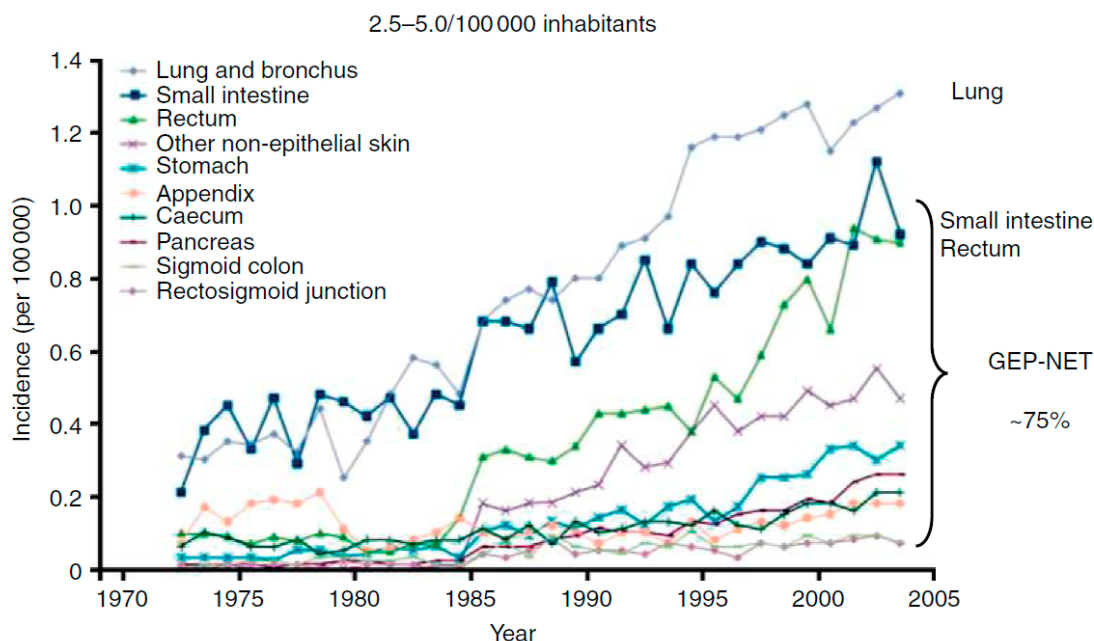


Figura 1. Incidencia de tumores neuroendocrino en el mundo occidental (Registro SEER, población de EE.UU. 1974-2005) [2].

1.3 Etiología

La mayoría de los TNE son esporádicos y no presentan una causa ni unos factores de riesgo concretos conocidos. En algunos casos pueden aparecer agregados en familias como síndromes de origen genético. Sin embargo, para la mayoría de los tumores, la causa no es evidente [4]. La excepción son alguno de los subgrupos de tumores gástricos de tipo carcinoide, cuyo origen está en relación directa con los niveles bajos de acidez y la anemia perniciosa [5].

1.4 Clasificación

La clasificación de los TNE-GEP siempre ha resultado una tarea compleja. Williams y Sandler lograron clasificar en 1963 los TNE-GEP de acuerdo a su origen embriológico como intestino anterior (estómago, duodeno, yeyuno superior y el páncreas), intestino medio (yeyuno inferior, íleon, ciego y apéndice) y los tumores del intestino grueso (colon y recto), encontrando considerables diferencias clínico-patológicas entre los tres grupos. No obstante, con el reconocimiento de nuevas

entidades en las dos últimas décadas (especialmente entre los tumores del intestino anterior), la utilidad de esta clasificación a nivel diagnóstico es limitada. Actualmente existen 3 clasificaciones:

- La Sociedad Europea de Tumores Neuroendocrinos (ENETS) elaboró recientemente las directrices para el diagnóstico y el tratamiento de TNE-GEP que contenía clasificaciones TNM específicas para cada localización [6,7]. Adicionalmente se recomendó, un sistema de clasificación de tres niveles basado en el recuento mitótico y el índice Ki67 [8]. Tanto el grado 1 (índice de Ki67 de 1-2 %) y el grado 2 (índice de Ki67 2-20 %) de TNE se consideran tumores bien diferenciados, mientras que el grado 3 (índice Ki67 mayor de 20 %) caracteriza a los tumores pobremente diferenciados.
- Otra clasificación reciente es la séptima edición del Comité Americano del Cáncer en consenso con la Unión Internacional para el Control del Cáncer (AJCC/UICC) que contiene una Clasificación TNM para TNE que difiere en varios criterios del sistema TNM de ENETS [9].
- Finalmente, en el segundo semestre del 2010, la OMS realizó una revisión de su clasificación para TNE-GEP adoptando algunos criterios de la clasificación de ENETS [10]. Esta nueva clasificación introdujo varios cambios a la edición previa del 2000. En esta clasificación los TNE son estratificados en cuatro grupos como se puede ver en la tabla 1.

OMS 2010

Tumor Neuroendocrino G1 (Carcinoide) y G2*

Carcinoma Neuroendocrino G3 de célula grande o célula pequeña

Adenocarcinoma neuroendocrino mixto

Lesiones preneoplásicas e hiperplásicas

Tabla 1. Clasificación OMS 2010 de neoplasias neuroendocrinas gastroenteropancreáticas. * G: Grado 1 (índice Ki67 1-2 %). Grado 2 (índice Ki67 2-20 %). Grado 3 (índice Ki67 >20 %). Los tumores carcinoideos deberán ser clasificados como G3 en caso de presentar un Ki67 mayor de 20%.

1.5 Factores predictivos

La amplia gama de clasificaciones propuestas para estos tumores en las últimas décadas ilustra su naturaleza biológica compleja [6,7,10-13]. La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2000/2004 incorporó varios predictores importantes como la diferenciación y tamaño tumoral, la invasión linfovascular, el índice de proliferación, la funcionalidad y el alcance de la diseminación a distancia. También reconoció la relevancia de la localización anatómica del tumor. Esta clasificación fue un paso importante en el campo ya que fue la primera en estratificar a los pacientes según pronóstico. Sin embargo, también tenía algunos inconvenientes importantes, incluyendo la mezcla de características patológicas y clínicas (es decir, funcionalidad, estadificación), así como la introducción de una categoría ambigua de tumores de "comportamiento incierto".

Para tratar de superar algunas de estas limitaciones, la clasificación de la OMS se actualizó en 2010 [10]. Uno de los cambios que se introdujeron en esta nueva clasificación, fue utilizar el término "neuroendocrinos", para reflejar algunas características únicas de estos tumores (es decir, la expresión de antígenos neurales), y "neoplasia", para abarcar toda la familia de tumores neuroendocrinos independientemente de la diferenciación o proliferación. Las neoplasias

neuroendocrinas (NNE) incluyen tanto los "tumores endocrinos bien diferenciados" y "carcinomas endocrinos bien diferenciados", denominados ahora como tumores neuroendocrinos (TNE), y los anteriormente designados "carcinomas endocrinos poco diferenciados", ahora denominados como carcinomas neuroendocrinos (CNE). Todas las NNE se consideran potencialmente malignas, aunque el pronóstico varía significativamente entre los subgrupos. Es importante destacar que la clasificación de NNE como TNE o CNE fue establecida por un sistema de clasificación por grados basado en la proliferación medida por el índice Ki67 específico o los valores de recuento mitótico, independientemente de la diferenciación tumoral.

La clasificación de la OMS de 2010 ha demostrado ser una clasificación simple, objetiva y reproducible, y ha establecido definitivamente la tasa de proliferación como el factor pronóstico más sólido en la clasificación de los TNE-GEP [14-18]. Sin embargo, los valores de corte empleados en esta clasificación son algo arbitrarios y no tienen en cuenta otros aspectos importantes de la morfología tumoral. De cierta manera, hubo una suposición implícita de que todos los tumores con una alta tasa de proliferación tendrían histología poco diferenciada, mientras que hay evidencia de que ambas variables pueden estar disociadas en un porcentaje de pacientes. De hecho, en los últimos años varios informes han cuestionado estos valores de corte [19-21], sobre todo en el caso de los CNE G3 que son un grupo más heterogéneo de lo esperado [22-26].

En este sentido, aunque la mayoría de los pacientes con TNE bien diferenciados, suelen presentarse con un curso relativamente indolente, incluso si la enfermedad metastásica está presente al momento del diagnóstico, algunos casos pueden progresar rápidamente, con supervivencias cortas [2]. Por ello sería muy útil disponer de biomarcadores para poder seleccionar a los pacientes que van a tener una progresión rápida y puedan beneficiarse del inicio temprano de tratamiento [27].

1.6 Tratamiento

Los enfoques terapéuticos disponibles son múltiples, y van desde la cirugía curativa hasta los procedimientos paliativos, como los tratamientos locorregionales hepáticos (embolización o radiofrecuencia), la cirugía paliativa, las terapias con radionúclidos o los tratamientos sistémicos como las terapias hormonal, inmune o citotóxica o las nuevas terapias dirigidas.

La primera opción terapéutica para TNE-GEP es el abordaje quirúrgico. Sin embargo, la curación completa no es posible en muchos casos, y el desarrollo de tratamientos médicos sistémicos ha ganado interés científico y clínico en los últimos años. En este contexto, los análogos sintéticos de la somatostatina (ASS) han surgido como una herramienta exitosa para el manejo de enfermedades neuroendocrinas [28,29]. Los ASS inhiben la secreción hormonal al unirse a los ssts, y por lo tanto proporcionan el alivio de los síntomas en pacientes con TNE funcionantes. Además, se ha demostrado que ejercen efectos antitumorales; Esto fue confirmado por los resultados del estudio PROMID [30], que observó un aumento significativo en el tiempo libre a la progresión tumoral en tumores intestinales funcionalmente activos e inactivos tratados con ASS y más recientemente por estudio CLARINET, que encontró un aumento de la mediana de supervivencia libre de progresión en los pacientes con TNE intestinales y pancreáticos tratados con ASS [31].

Con respecto a los agentes citotóxicos estándar se ha demostrado que tienen una actividad limitada en TNE-GEP [32-34]. Esta falta de actividad se ha relacionado con las características histológicas típicas de estos tumores, tales como una baja tasa de proliferación medida por el grado de diferenciación y también con la expresión de marcadores biológicos relacionados con la resistencia a la quimioterapia (como la sobreexpresión de Akt) [35]. La limitada eficacia de estos fármacos estándar ha conducido a la investigación de nuevos agentes terapéuticos que intentan explotar las características fenotípicas de los TNE-GEP.

Una de las principales características de los tumores neuroendocrinos es que son tumores muy vascularizados, lo cual se ha relacionado con una alta expresión de moléculas proangiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores (VEGFR1-3) [36]. Se han desarrollado por ello terapias dirigidas frente al proceso de angiogénesis tumoral en TNE-GEP como es el caso de sunitinib, un potente inhibidor competitivo de ATP de múltiples receptores de superficie con actividad de tirosina quinasa, tales como VEGFR1-3, PDGFR α -b (receptor del factor de crecimiento similar a plaquetas), FLT-3 (tirosina quinasa 3 similar a fms), c-KIT y RET que están implicados en procesos de proliferación celular y angiogénesis principalmente [37,38]. Este fármaco ha demostrado actividad antitumoral y ha sido aprobado para el tratamiento de TNE pancreáticos avanzados [39,40].

Otra de las principales vías metabólicas involucradas en la patogénesis de TNE-GEP es la vía PI3K- (PTEN) -Akt-mTOR. La diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) es una serin-treonina quinasa de la ruta de señalización intracelular de PI3K (fosfoinositol-3-cinasa)-Akt. Esta vía de transducción de señales juega un papel primordial en la regulación del crecimiento celular, proliferación, motilidad y supervivencia, así como en la síntesis y transcripción de proteínas [41,42]. Recientemente se ha aprobado everolimus, un inhibidor de mTOR, para el tratamiento de TNE pancreáticos e intestinales [43-48].

2. Regulación del eje neuroendocrino: papel de somatostatina, cortistatina y ghrelina.

La síntesis y liberación de la hormona de crecimiento (GH) hipofisaria se ha considerado clásicamente modulada por señales del sistema nervioso central (SNC) y señales periféricas (Figura 2). A nivel central, existen factores hipotalámicos reguladores positivos como GHRH (hormona estimuladora de la hormona del crecimiento) y negativos como la somatostatina (SST) [49]. Además, en los últimos años han emergido nuevos factores estimuladores, entre los que destaca la ghrelina, que es producida principalmente en el estómago (ejerciendo de nexo de unión entre metabolismo y el eje GH/Factor de crecimiento insulínico 1) [50] pero que también se secreta en hipotálamo e hipófisis [51], así como nuevos factores inhibidores, como la cortistatina (CORT) [52] producida principalmente en la corteza cerebral, aunque también se ha demostrado su producción a nivel hipotalámico. Estas acciones reguladoras son bien conocidas actualmente, así como las relaciones hipotálamo-hipófisis -tracto gastrointestinal (TGI)-hígado (Figura 2).

La correcta regulación del eje neuroendocrino es esencial para el mantenimiento de la homeostasis metabólica del organismo y sus alteraciones pueden contribuir al desarrollo de patologías graves de gran prevalencia como son la diabetes, la obesidad, la anorexia o el cáncer. En consecuencia, se intuye que puede existir una red de interacciones entre el eje GH y otros sistemas capaces de regular el crecimiento normal y patológico (Figura 2). Por tanto, el estudio de los sistemas reguladores del eje somatotrópico, como son el sistema SST y ghrelina, puede contribuir al conocimiento de esta patología, ya que la alteración de estos sistemas de regulación puede favorecer de manera relevante el desarrollo de estas patologías endocrino metabólicas.

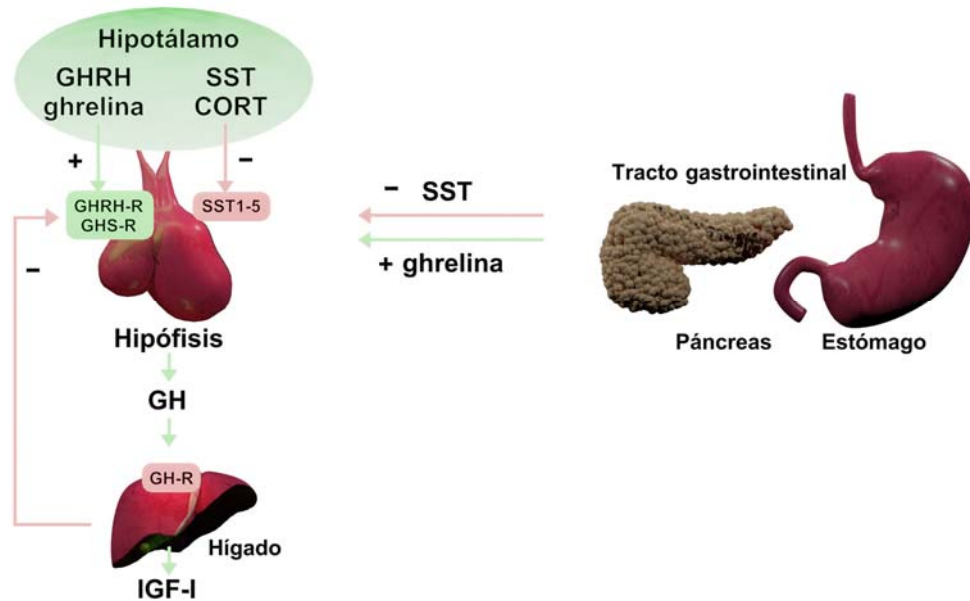


Figura 2. Regulación central (hipotálamo) y periférica (tracto gastrointestinal). Papel de somatostatina, cortistatina y ghrelina.

2.1 Somatostatina, cortistatina, ghrelina y sus receptores como factores reguladores metabólicos

La SST, la CORT y la ghrelina son péptidos estructural, evolutiva y funcionalmente diferentes, pero con similitudes importantes. En los tres casos, los péptidos maduros se generan a partir de preprohormonas [53]. Además, ejercen sus funciones a través de su unión a uno o más receptores acoplados a proteínas G (GPCR) [50,54]. En concreto, las funciones más conocidas de estos péptidos reguladores son las relacionadas con la modulación de la secreción de la GH, puesto que la SST y la CORT inhiben la liberación de GH mientras que la ghrelina la estimula [55].

2.2 Sistema SST/CORT y sus receptores

La SST fue descubierta en 1973 en el SNC, donde se vio que actuaba como un factor inhibitorio de la secreción de GH [49]. El gen *sst* da lugar a un precursor, la preprosomatostatina, que tras un procesamiento de hidrólisis proteolítica da origen a dos péptidos, uno formado por 28 aminoácidos (SST-28) que se produce a lo largo del

INTRODUCCIÓN

TGI y otro péptido de 14 aminoácidos, la SST-14, los cuales poseen una estructura cíclica gracias a la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína (Figura 3).

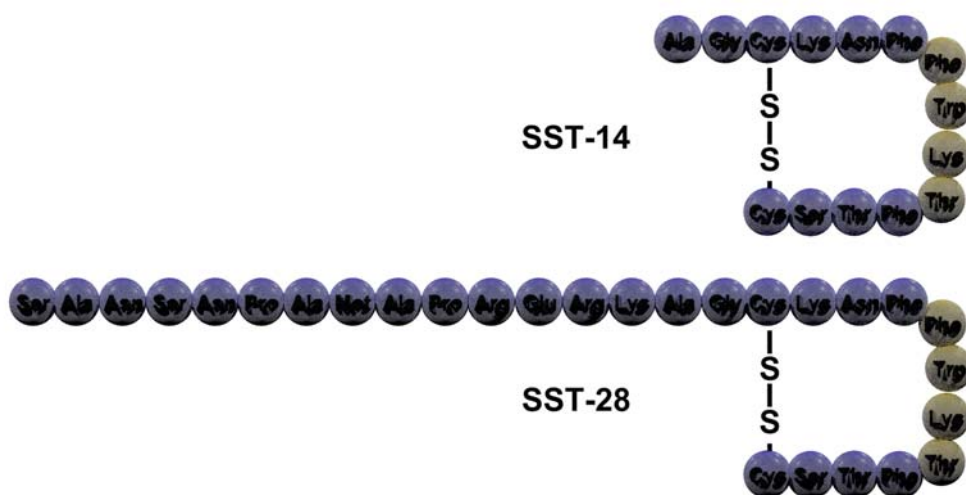


Figura 3. Esquema de la secuencia de aminoácidos de SST-14 y SST-28.

Más de 20 años después del descubrimiento de la SST, en 1996, se aisló un neuropéptido similar a SST en roedores, la cortistatina (CORT), denominada así por su alta expresión en la corteza cerebral y su capacidad para deprimir la actividad neuronal [52]. Del mismo modo que es procesada la SST, el gen cort genera varios péptidos: CORT-14 (con 14 aminoácidos comunes en rata y ratón, con un análogo de 17 aminoácidos humanos) y CORT-29 (con 29 aminoácidos solamente observada en rata y humano, pero no en ratón) siendo ambos péptidos análogos a la SST-14 y SST-28 (Figura 4).

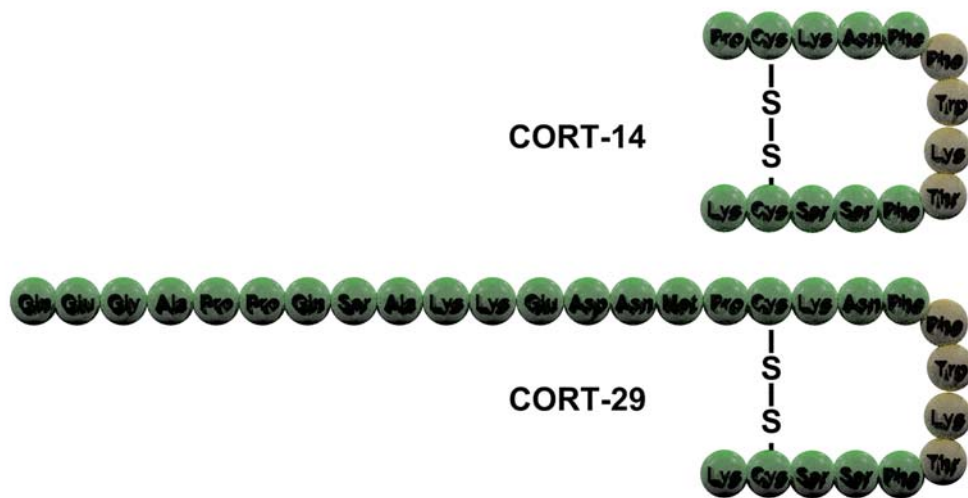


Figura 4. Esquema de la secuencia de aminoácidos de CORT-14 y CORT-29.

Inicialmente, resultó sorprendente la semejanza estructural de la CORT-14 con la SST-14, ya que ambos comparten 11 de sus 14 aminoácidos, en los que destacan los cuatro aminoácidos que forman el motivo FWKT (Phe7-Trp8-Lys9-Thr10) [56], el cual es imprescindible para la unión específica a los receptores de SST y su consiguiente activación, así como el puente disulfuro existente, el cual permite la estructura cíclica en ambas moléculas [57]. Esta homología entre las dos moleculares se debería al hecho que SST-14 procede de un precursor, la prosomatostatina (formada por 92 aminoácidos), la cual se genera a partir de un precursor de 116 aminoácidos, la preprosomatostatina, mientras que el precursor de la CORT-14, la preprocortistatina muestra una alta homología estructural con la preprosomatostatina, lo que en conjunto parece indicar que ambos precursores procederían de un ancestro común (Figura 5).

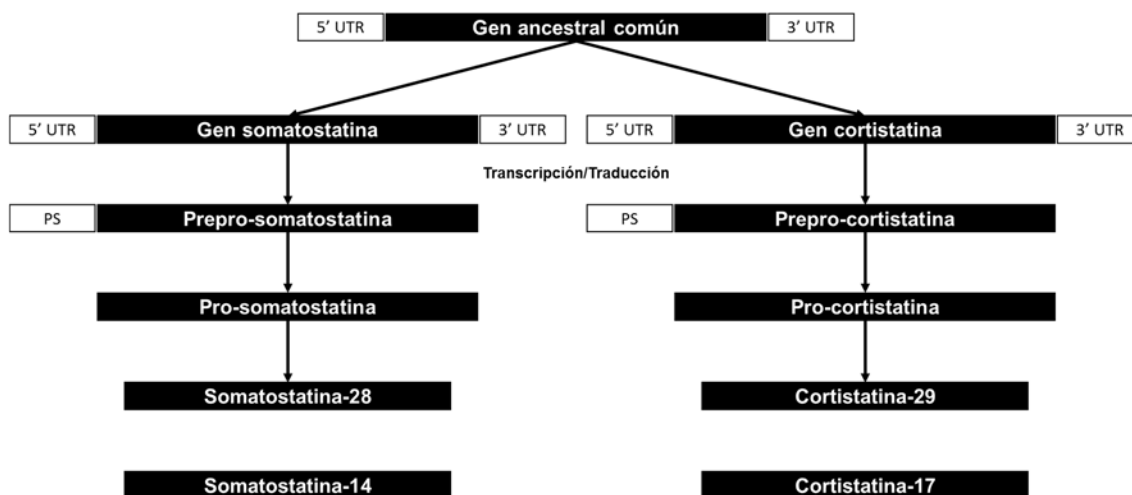


Figura 5. Representación esquemática de la evolución y procesamiento de los genes SST/CORT a partir de un posible gen ancestral común.

Las acciones biológicas que desempeña la SST y la CORT están medidas por la unión a una familia de cinco receptores, denominados ssts (sst1-5), de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G [49], los cuales son codificados por cinco genes distintos (Figura 6), a los que se unen con una afinidad similar.

Además, se han descubierto eventos co-transcripcionales de splicing que generan receptores truncados, como es el caso del receptor sst2 de ratón, el cual es procesado para dar lugar a dos isoformas, sst2A y sst2B, que difieren en la longitud de su cola citoplasmática [54,58]. Asimismo, recientemente se han identificado nuevas variantes truncadas del receptor sst5, que presentan un número menor de dominios transmembrana y que responden diferencialmente a SST y CORT. Concretamente en humanos, existen dos isoformas funcionales truncadas denominadas sst5TMD5 y sst5TMD4 [59] (Figura 6).

La expresión de estos sst1-5 ha sido descrita en el SNC y periférico, páncreas, TGI, hipófisis, riñón, tiroides, bazo, pulmón, células inmunes y en tejido neuroendocrino tanto normal como tumoral [60,61].

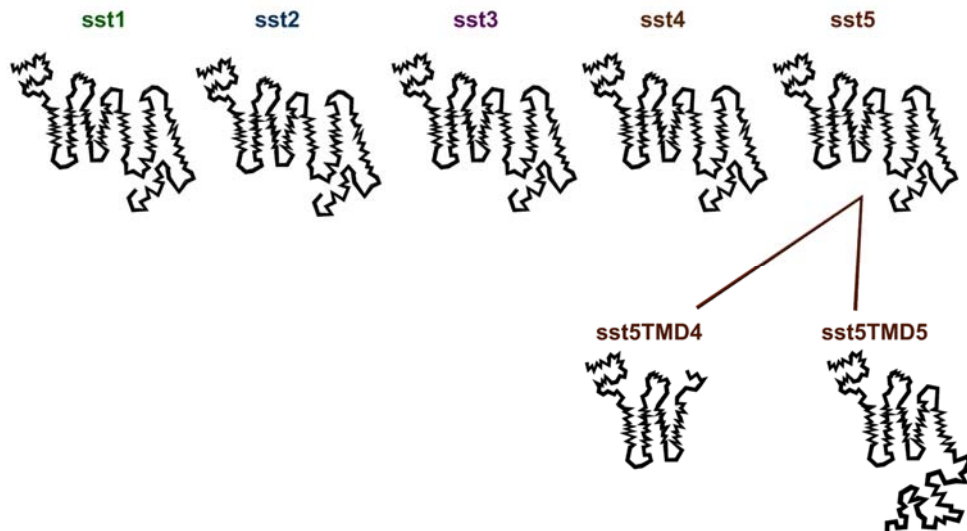


Figura 6. Representación de los receptores sst1-sst5 con siete dominios transmembrana y variantes truncadas de sst5 (sst5TMD4 y sst5TMD5) adaptado de [62].

2.2.1 Funciones de SST

SST se identificó originalmente como un factor inhibidor de la secreción de GH en las células somatotropas de la hipófisis [49]; sin embargo, actualmente se sabe que es un péptido pleiotrópico ya que se encuentra extensamente expresado a lo largo del SNC, así como en gran parte de los tejidos periféricos.

Este péptido ejerce funciones generalmente de carácter inhibitorio de los procesos celulares, de la secreción endocrina y exocrina, proliferación celular, motilidad gastrointestinal, neuromodulación, neurotransmisión, actuando también sobre la función del sistema inmune o la función pancreática.

2.2.2 Funciones de CORT

La CORT, al igual que SST, está ampliamente distribuida a lo largo del organismo en múltiples tejidos. En este sentido, el hecho de que CORT se exprese de forma extensa a lo largo del organismo, unido a la homología y origen común que

muestra con SST y la afinidad comparable a la SST que presenta por los ssts, han originado la asunción de que CORT podría ser un análogo estructural, farmacológico y funcional de SST a nivel endocrino [63]. Sin embargo, estudios más recientes donde se han caracterizado ratones deficientes de CORT, han puntualizado ciertos aspectos únicos, incluso opuestos, de la función de la CORT con respecto a la de la SST; por ejemplo, se ha demostrado que la CORT al igual que la SST inhibe la expresión de GH y hormona adrenocorticotropa (ACTH) en células hipofisarias de ratones y primates; sin embargo, la CORT, pero no SST, estimularía la producción de prolactina (PRL) a través de mecanismos moleculares específicos [64]. Prueba de las diferencias farmacológicas y funciones entre ambos péptidos ha sido la reciente observación de que las variantes truncadas del sst5 descritas en humano [59] y en ratón [65] tienen una habilidad diferente para mediar la señalización por calcio intracelular inducida por ambos péptidos.

Además, CORT pero no SST, es capaz de unirse a otros receptores fuera del sistema SST, como el receptor de ghrelina, GHSR [66], lo que sugeriría que CORT es otro ligando endógeno del receptor de la ghrelina, resultando un nexo de unión entre ambos sistemas SST y ghrelina. Adicionalmente, existen estudios que añaden complejidad a este aspecto al afirmar que el receptor sst5 puede interaccionar físicamente con GHSR formando heterodímeros [67], lo que podría modificar la señalización iniciada por ambas SST, CORT y/o ghrelina.

Por otro lado, los patrones de expresión tisular mostrados por SST y CORT difieren de tal manera que sugeriría que ambos péptidos podrían jugar distintos papeles en el organismo [68]. En particular, ha sido descrita la capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria de CORT, pero no en el caso de SST, que podría deberse a su expresión en células del sistema inmune [69-71].

2.3 Sistema ghrelina y su receptor

La ghrelina fue originalmente identificada en estómago de rata. Así, el conocimiento de un receptor huérfano acoplado a proteína G, que estimula la producción de GH, denominado Ghrowth-Hormone Secretagogue Receptor o GHSR [72], permitió el posterior descubrimiento de su ligando natural endógeno en 1999 [50]. Este péptido maduro de 28 aminoácidos es la única proteína animal modificada por O-acilación con un grupo octanoilo (un ácido graso de 8 carbonos) en posición 3 de un grupo hidroxilo de la serina (Figura 7), una modificación que es esencial para que el péptido ejerza su función y se una a su receptor, GHSR. La enzima responsable de esta acilación se descubrió más tarde y fue denominada ghrelina-O-aciltransferasa o GOAT [73,74].

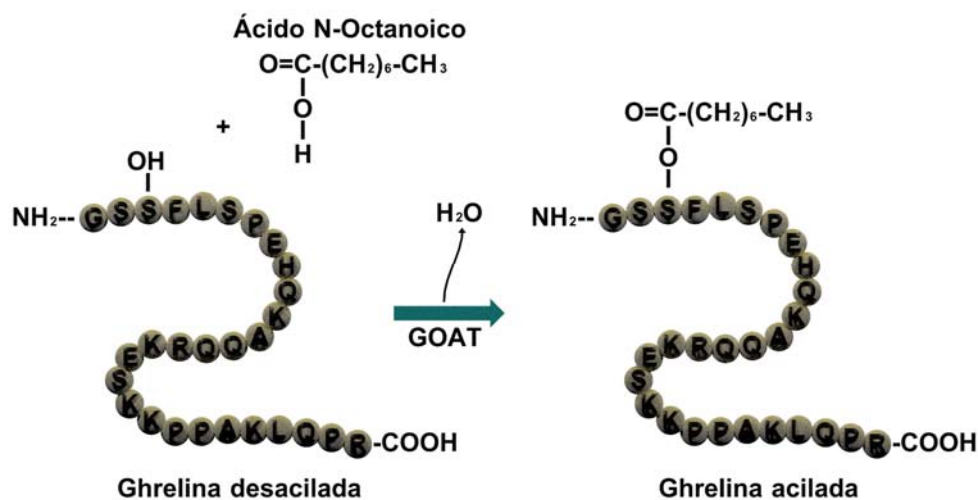


Figura 7. Proceso de acilación de la ghrelina.

Aunque la ghrelina de 28 residuos es el producto mayoritario y mejor conocido, también se han descrito otras moléculas generadas mediante procesamiento alternativo, modificaciones post-traduccionales o procesos de splicing, incluida la obestatina [75]. En este sentido, en 2007, se describió la existencia de una variante de la ghrelina en ratón, originada por un proceso de splicing alternativo que implica la retención del intrón 2, denominado In2-ghrelina [76]. Posteriormente, se descubrió la existencia de la misma variante de splicing alternativo (In1-ghrelina) en humanos y en

INTRODUCCIÓN

primates [77]. Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado el receptor al que se unen estas variantes truncadas de la ghrelina (Figura 8).

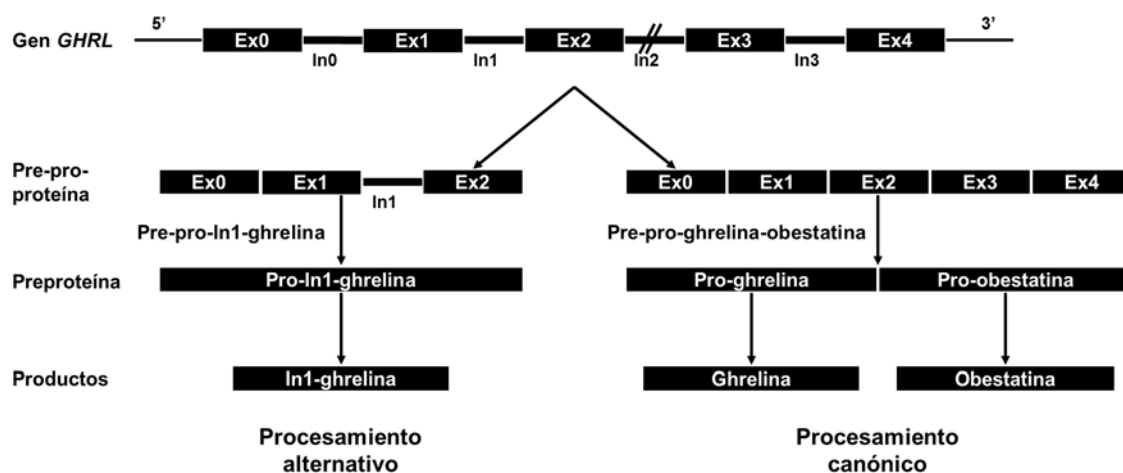


Figura 8. Representación esquemática del procesamiento del gen de la ghrelina.

En este sentido, cabe destacar que la existencia de variantes de splicing alternativo del sistema regulador de la ghrelina, no solo ocurre a nivel del gen de ghrelina sino también a nivel del gen de su receptor, cuya transcripción genera el receptor GHSR, isoforma truncada 1b [78]. Por último, además del TGI, donde la presencia de ghrelina ha sido clásicamente descrita [50,79], la ghrelina ha sido identificada en gran número de tejidos como cerebro, hipotálamo, hipófisis, ovario, glándula adrenal, páncreas, etc. donde puede ejercer una gran variedad de funciones [80].

2.3.1 Funciones de la ghrelina

La ghrelina es un péptido pleiotrópico que fue originalmente identificado por actuar como un potente estimulador de la secreción de GH hipofisaria [50]. Además, esta función estimuladora se extiende también a nivel de secreción de ACTH, cortisol y PRL. A su vez, la ghrelina es bien conocida por ser una hormona orexigénica, ya que promueve el aumento del apetito, así como la ingesta (se produce antes de las comidas y en respuesta a nutrientes) [81,82].

Entre las diversas funciones de la ghrelina, también se encuentran las acciones sobre la modulación de la motilidad gastrointestinal y secreción ácida, el metabolismo glucídico y lipídico, a nivel cardiovascular regula la función cardíaca y la presión sanguínea, la función inmune y además posee capacidad moduladora de la proliferación y supervivencia celular [83]. Adicionalmente, la ghrelina participa en la regulación de la función pancreática (estimulando, por ejemplo, la función beta pancreática, así como la secreción de insulina) [84], el sueño, comportamiento e incluso en la memoria [85]. Por su parte, se ha comprobado que la expresión de la variante de splicing In2-ghrelina se encuentra regulada en estados metabólicos extremos (ayuno/obesidad) de manera tejido dependiente [76]. Asimismo, se ha evidenciado que la variante homóloga en humanos, In1-ghrelina, se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama y que su presencia aumenta las características de proliferación en células de este tumor [77], por lo que parece que podría tener cierta relevancia en la fisiopatología tumoral.

3. Papel del sistema SST/CORT y ghrelina en la fisiopatología del cáncer

Existe todavía debate sobre la expresión de receptores de sst y la respuesta a tratamiento con ASS. Incluso se ha sugerido una posible participación de receptores y mecanismos moleculares diferentes debido a que los efectos antiproliferativos y antisecretores ocurren en momentos diferentes [86]. En general los efectos antiproliferativos de los ASS se han asociado a su afinidad por sst2 [87], tanto en el caso de acromegalia como de TNE-GEP. Asimismo, la taquifilaxia que se desarrolla ocasionalmente durante el manejo a largo plazo de los TNE se ha atribuido a la pérdida de expresión de sst2 por internalización del receptor y su degradación [88]. Sin embargo, no todos los estudios han evidenciado una relación significativa en los niveles de expresión de sst con la respuesta al tratamiento con ASS [89], por lo que la posibilidad de dirigir una terapia de acuerdo a los patrones de expresión de sst es un tema aún no resuelto.

Asimismo, se ha descrito recientemente que la interacción de la variante truncada sst5TMD4 con el receptor sst2 podría interferir con la señalización intracelular de la SST [90], lo que sugiere un posible papel de las mutaciones de sst5 como un posible causante de la proliferación celular aberrante. De hecho, la presencia de esta variante truncada en ciertos tumores podría ser un posible marcador de pronóstico y de respuesta al tratamiento. A modo de ejemplo, sst5TMD4 se ha asociado a un aumento del riesgo de comportamiento maligno en el cáncer de mama [90] y en el cáncer de tiroides [91], y a una disminución de la capacidad de la octreotida para normalizar los niveles de GH en somatotropinomas [92].

Con respecto a la ghrelina, cambios en la expresión de componentes específicos de este sistema pueden estar asociados con el desarrollo y/o la progresión de diversos tumores. Específicamente, se ha demostrado un aumento en la expresión de varios

componentes clave del sistema de ghrelina incluyendo la ghrelina nativa, los receptores, GHSR1a y GHSR1b, así como la variante truncada In1-ghrelina en diversos tumores incluyendo adenomas hipofisarios, cáncer de mama y próstata, sugiriendo así un posible papel autocrino o paracrino del sistema ghrelina en patogénesis tumoral [73,93]. En el caso de los TNE-GEP hay una evidencia limitada y meramente descriptiva de la presencia de algunos componentes del sistema de ghrelina en estos tumores [94-96], pero su papel específico y relevancia en el desarrollo y/o progresión de TNE-GEP no se ha explorado aún.

Otro tema de interés actual en TNE-GEP se centra en la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos a partir de la red vascular existente, hecho crucial para la invasión local tumoral y la diseminación metastásica. Varias moléculas, incluyendo el VEGF, angiopoietinas (Ang) -1 y -2, y la familia de receptores de tirosina quinasa Tie-2 (o Tek) [97-99], ejercen un efecto regulador importante del angiogénesis. VEGF actúa como un factor pro-angiogénico en el endotelio vascular, induciendo la proliferación y la formación de nuevos vasos. Por otro lado, las angiopoietinas solubles son secretadas por células endoteliales y epiteliales en respuesta al estrés, la hipoxia y la inflamación, y se unen a Tie-2 para ejercer su acción. En concreto, mientras que Ang-1 promueve la supervivencia de las células endoteliales, ejerciendo efectos anti-inflamatorios y anti-permeables [98-100], la Ang-2 puede producir bien una regresión vascular, o por el contrario un efecto pro-angiogénico si VEGF está presente. Por lo tanto, el sistema de Ang/Tie2 parece jugar un importante efecto en la remodelación de la red vascular [101] y como se ha descrito recientemente, un papel relevante en la patogénesis de los TNE [102]. En este sentido, recientemente se ha postulado una posible interacción entre el sistema angiopoyético con el sistema SST [103-109], aunque el efecto sobre la angiogénesis de las variantes truncadas no se ha caracterizado completamente hasta el momento.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de la influencia de diversos marcadores clínicos y moleculares en el fenotipo de enfermedad y en la supervivencia de los TNE-GEP. Concretamente, se han explorado el papel que desempeñan en la fisiopatología de los TNE-GEP tanto marcadores clásicos como el grado tumoral, como biomarcadores novedosos como el sistema de regulación formado por SST, CORT, ghrelina y sus receptores.

Para alcanzar dicho objetivo, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Elaborar un registro de pacientes con TNE-GEP en el Hospital Universitario de La Princesa. Evaluar el impacto pronóstico en la supervivencia de la edad, sexo, síndrome hormonal asociado, estadificación TNM, origen tumoral y grado tumoral (según OMS 2010). Realizar tabla pronóstica de riesgo de mortalidad de predictores clínicos independientes.
2. Estudio del papel del sistema SST/CORT en los TNE-GEP.
 - Valorar la expresión de las variantes normales de los sst1-5, las variantes truncadas (sst5TMD4 y sst5TMD5) y sus ligandos [somatostatina (SST) y cortistatina (CORT)] en TNE-GEP en zona tumoral y zona aparentemente sana adyacente al tumor y en tejidos controles mediante inmunohistoquímica y qPCR.
 - Realizar ensayos funcionales mediante transfección de receptores truncados en líneas celulares de tumores neuroendocrinos para evaluar su papel biológico.
 - Estudiar correlación del sistema SST/CORT con marcadores de angiogénesis (angiopoyetinas y sus receptores) en TNE-GEP. Correlacionar la expresión de marcadores de angiogénesis (Ang1-2, Tie y VEGF) con la expresión de receptores de somatostatina en tejido tumoral, zona

OBJETIVOS

aparentemente sana adyacente al tumor y tejidos controles mediante qPCR e inmunohistoquímica.

3. Analizar el papel del sistema ghrelina sobre el desarrollo TNE-GEP.

- Comparar la expresión del sistema ghrelina en zona tumoral, zona aparentemente sana adyacente al tumor y en tejidos controles. Comprobar expresión mediante inmunohistoquímica y qPCR.
- Realización de ensayos funcionales mediante transfección de In1-ghrelina en líneas celulares de tumores neuroendocrinos para evaluar papel biológico.

4. Conocer la relación entre parámetros clínicos con los sistemas SST/CORT, y ghrelina incluyendo grado y estadio tumoral, presencia o no de enfermedad a distancia, y enfermedad progresiva o estable.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Registro de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa

Se analizaron 104 pacientes (55 mujeres, edad 61 ± 16 años) que fueron diagnosticados en nuestro centro entre 1995 y 2016. Los datos relativos al examen físico, la historia clínica y el trabajo de laboratorio se obtuvieron de las visitas de rutina utilizando la información disponible en los registros clínicos. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo con los criterios de ENETS y OMS (localización tumoral y tamaño, Ki67, tasa mitótica y metástasis) [6,7]. Además, según los hallazgos histopatológicos, todas las neoplasias bien diferenciadas se clasificaron como TNE y clasificaron G1 (Ki67 <2%) o G2 (Ki67 2-20%) y todas las neoplasias mal diferenciadas fueron designadas como carcinomas neuroendocrinos (CNE) G3 (Ki67 > 20%) [10].

El registro fue aprobado por el Comité Ético local y realizado de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito antes de su inclusión.

2. Cohorte seleccionada para estudio molecular

2.1 Población

Se seleccionaron 26 pacientes consecutivos [15 (57,7%) mujeres, edad media $58,4 \pm 14,4$ años] con TNE-GEP que se sometieron a cirugía en nuestro centro de 2001 a 2009. Todos los pacientes fueron cuidadosamente seleccionados para detectar la presencia de otras neoplasias, con especial atención a verificar una asociación con síndromes genéticos (neoplasia endocrina múltiple tipo 1, síndrome de von Hippel-Lindau, tuberosclerosis y síndromes de neurofibromatosis). Sólo un paciente portaba una mutación para neoplasia endocrina múltiple tipo 1.

Los pacientes fueron tratados siguiendo las recomendaciones y directrices actuales [110]. La cirugía electiva fue la primera opción de tratamiento en todos los casos y se administró terapia adyuvante con ASS si se observaba evidencia de enfermedad residual. La evaluación de seguimiento clasificó a los pacientes en dos categorías según su estado clínico: 1) enfermedad no residual, si se había logrado una resección completa después de la cirugía y no se había evidenciado recaída tumoral durante el seguimiento y 2) enfermedad residual, en casos de evidencia de enfermedad tumoral después de la cirugía o recaída de la enfermedad durante el seguimiento. La mediana de seguimiento fue de 87,5 meses (rango 19-214 meses).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético local y realizado de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito antes de su inclusión.

2.2 Muestras

Se evaluó un total de 72 tejidos incluidos en parafina fijados con formalina. De éstas, 42 eran muestras tumorales adecuadas con diagnóstico patológico de TNE (26 origen primario y 16 origen metastásico) y 30 correspondían a tejidos normales (26 muestras correspondían a regiones no tumorales adyacentes y 4 tejidos normales de control que provenían de pacientes sometidos a resección pancreática, intestinal o hepática), que se utilizaron como controles negativos para qPCR. Además, se usaron tres tejidos pancreáticos y tres tejidos intestinales normales como controles negativos de inmunohistoquímica. Todas las muestras fueron tomadas y tratadas de acuerdo con los reglamentos y la aprobación de la Junta de Revisión Institucional en el Hospital Universitario de La Princesa.

Se llevó a cabo una revisión exhaustiva de las secciones de hematoxilina y eosina por un patólogo endocrino (Dra. Magdalena Adrados) para asegurar la identificación de áreas relevantes y representativas de tejidos tumorales y no tumorales.

3. Cultivo de células

Con el fin de proporcionar una base biológica para los ensayos funcionales, se cultivaron líneas de células de TNE previamente validadas. Específicamente, se utilizaron células carcinoides BON-1 [111] y células derivadas de somatostatinomas QGP-1 [112]. Se cultivaron células BON-1 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12, Life Technologies, Barcelona, España) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Sigma-Aldrich, Madrid, España), glutamina al 1% (Sigma-Aldrich) y 0,2% de antibiótico (Gentamicina/Anfotericina B, Life Technologies). QGP-1 se mantuvo en medio RPMI 1640 (Lonza, Basilea, Suiza), suplementado con FBS al 10%, glutamina al 1% y antibiótico al 0,2%. Ambas líneas celulares se cultivaron a 37°C, en una atmósfera humidificada al 5,0% de CO₂.

4. Aislamiento de ARN y retrotranscripción

El ARN total se aisló utilizando Reactivo TRIzol (Life Technologies) en el caso de líneas celulares siguiendo las instrucciones del fabricante y se trató con DNasa (Promega, Barcelona, España). La extracción de ARN total de muestras de parafina se realizó utilizando RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Limburgo, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La cantidad de ARN recuperado (antes y después del tratamiento con DNasa) se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC, EE.UU.). La calidad del ARN extraído se evaluó mediante el mismo sistema usando la relación de absorbancia A₂₆₀/A₂₈₀ y A₂₆₀/A₂₃₀, requiriendo un mínimo de 1,8 en ambos para realizar qPCR. Un microgramo de ARN se transcribió inversamente a ADNc usando cebadores aleatorios [First Strand Synthesis (Thermo Scientific)].

5. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR se realizaron usando el Brilliant III SYBR Green Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) en el sistema Stratagene Mx3000p para sst1-5, sst5TMD4, sst5TMD5, y sus ligandos somatostatina (SST) y cortistatina (CORT) como componentes del sistema SST/CORT, así como ghrelina nativa, In1-ghrelina, GOAT, GHSR1a, GHSR1b como componentes del sistema ghrelina. Para cada reacción, se mezclaron 10 µl de mezcla maestra, 0,3 µl de cada cebador, 8,4 µl de H₂O destilada y 1 µl de ADNc (50 ng) en un volumen total de 20 µl. El programa de retrotranscripción usado fue el siguiente: (1) paso de desnaturalización a 95°C durante 3min, (2) 40 ciclos de desnaturalización (95°C durante 20 segundos), unión de cebadores y extensión de polimerasa (61°C durante 20 segundos) y (3) un último ciclo en el que los productos de PCR se someten a disociación dependiente de temperatura graduada (55°C a 95°C donde el incremento fue 0.5°C/30 segundos) para verificar que sólo se amplificó un producto. Se diseñaron cebadores específicos (Tabla 2) con el software Primer3 y el software de sistema de PCR en tiempo real StepOne™ v2.3 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EE.UU.).

Las reacciones de qPCR para Ang-1, Ang-2, Tie-2 y VEGF se realizaron utilizando el kit LightCycler Detection System (Roche Diagnostics, Madrid, España) y el kit LightCycler FastStart ADN Master SYBR Green I (Roche Diagnostics).

Las muestras se realizaron en la misma placa frente a una curva estándar para estimar el número absoluto de copias de ARNm (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 copias de ADNc sintético para cada transcripción) y una muestra No RT como control negativo. La normalización de todos los genes se realizó de acuerdo con el valor de la β -actina y los resultados se presentaron como número total de copias, ajustado para la β -actina.

Gen	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido	Tamaño del producto (bp)	GeneBank N.º Acceso
SST	AACCCAACCCAGACGGAGAA	TAGCCGGGTTTGAGTTAGCA	111	BC032625
CORT	CTCCAGTCAGCCCAAGAT	CAAGCAGGAAAGTCAGGAG	173	NM001302
sst1	CACATTTCTCATGGCTTCCT	ACAAACACCATCACCAACATC	165	BC035618
sst2	GGCATGTTTGACITTTGTGGTG	GTCTCATTCAGCCGGGATTT	185	NM001050
sst3	TGCCITCTTTGGGCTCTACTT	ATCCTCCTCTCAGTCTTCTCC	190	NM001051
sst4	CGTGGTCGCTTTGTGCTCT	AAGGATCGGCGGAAGTTGT	174	BC069063
sst5	CTGTGTTTGGGGATGTT	GAAGCTCTGGCGGAAGTTGT	183	NM001053
sst5TMD5	GCGCCGTCCTTCATCATCTAC	CAGGAAAAGCTGTTGTTGG	159	DQ448303
sst5TMD4	TACCTGCAACCGTCTGCC	AGCCTGGGCCTTTCTCCT	98	DQ448304
ghrelina	TCAGGGGTTTCAGTACCAGCA	CAAGCGAAAAGCCAGATGAG	158bp	NM_001134941.2
In1-	TCTGGGCTTCAGTCTTCTCC	GTTTCATCCTCTGCCCCCTTCT	215bp	GU942497.1
ghrelina	TCTGGGCTTCAGTCTTCTCC	ACTGCCACGTTTAGGCATTCT	161bp	NM_001100916.1
GOAT	TGAAAATGCTGGCTGTAGTGG	AGGACAAAGGACACGAGGTTG	168bp	NM_198407.2
GHSR1a	GGACCAGAACCCACAAAGCAA	AGAGAGAAAGGAGAGAGGCACA	107bp	NM_004122.2
GHSR1b	GATGGACACAGTCCACAACC	ATTCTTCCAGCCTCTTTGG	269	NM_001314051.1
Ang-1	CTGCAAGTGCTGGAGAACATCATGG	GTGTTCCAAAGAGCTGAAGTTC	252	NM_001147.2
Ang-2	TGTTCTGTGCCACAGGCTG	CACTGTCCCATCCGGCTTCA	318	NM_000459.4
Tie-2	GAGATGAGCTTCTACAGCAC	TCACCGCCTCGGCTTGTACAT	222	NM_001287044.1
VEGF	CCCTCTCTGGCCCTGTCTCTTC	GCAGCGCCTCACAACTCCGTCAT	265	NM_001126118.1
TP53	TCCCTCGCTGCACAAATCTC	ACGACCCGATGGCCATAGA	72	NM_000633.2
Bcl2	ACTCTCCAGCCTTCTCTTCT	CAGTGATCTCCTTCTGTCATCCT	176	NM001101
β-actina				

Tabla 2. Cebadores utilizados en los distintos estudios de esta Tesis Doctoral. En la tabla se indica el nombre del gen estudiado, secuencia sentido y antisentido de los diferentes cebadores estudiados, el tamaño del producto amplificado en pares de bases (bp) y el número de acceso en GeneBank (NCBI).

6. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Se realizó inmunohistoquímica en secciones fijadas con formalina de tejidos parafinados. Las secciones de tejido se desparafinaron con xileno y se rehidrataron usando concentraciones decrecientes de alcohol. La recuperación antigénica se llevó a cabo mediante la incubación de las secciones en una solución comercial de citrato 10 mM (pH 6,0, Master Diagnostica, Granada, España), usando un horno microondas durante 15 min a máxima potencia (700 W). Antes de la inmunotinción, las secciones se enfriaron a temperatura ambiente y se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena por incubación con una solución de bloqueo de peroxidasa (3% de H₂O₂ en Metanol) durante 25 minutos, bajo agitación suave. Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a 4°C con diferentes anticuerpos: monoclonal anti-CgA de ratón (NBP2-33198AF488, Alexa Fluor 488, Novusbio Littleton, CO, EE.UU.), anti-Ki-67 monoclonal de ratón (M7240, Dako Cytomation Dinamarca A/S, Copenhagen, Dinamarca), anti-sinaptofisina monoclonal de conejo (NB110-57606, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-sst5TMD4 policlonal de conejo [59], anti-Ang-1 policlonal de cabra (N.º de catálogo AF923, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), anti-Ang-2 policlonal de cabra (N.º de catálogo AF623, R&D Systems) o anti-Tie-2 policlonal de cabra (N.º de catálogo AF313, R&D Systems). A continuación, se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con HRP (Envision System, Dako, Barcelona, España). Por último, las secciones se cubrieron con 3.3'-Diaminobencidina (Envision System, 2-Solution DAB Kit), se contratiñeron con hematoxilina de Carazzi, se deshidrataron en gradientes alcohol y xileno, y se montaron con medio de montaje (Panreac). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario, dando lugar a una ausencia completa de tinción en todos los casos. Las secciones se analizaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse E400 (Nikon, Japón).

Una única histopatóloga (Magdalena Adrados), ajena a los datos clínicos, valoró todas las inmunohistoquímicas (IHQ) y los casos de inmunofluorescencia (IF). Las muestras de tejido se puntuaron manualmente usando el método de puntuación inmunohistoquímica (IHS) propuesto por Pinato et al. [113]. Específicamente, para cada muestra se asignó un IHS de 0 a 300, basado en la multiplicación del porcentaje de células que muestran expresión inmunohistoquímica (0-100) y la intensidad de la señal (clasificada 1-3) en un mínimo de 100 células por cristal evaluado. Cada puntuación fue reevaluada individualmente, y se calculó la media de tres lecturas.

A continuación, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia para examinar el patrón de tinción y co-expresión de sst5TMD4, marcadores angiogénicos y CgA. Las secciones de tejido se desparafinaron y se recuperó el antígeno como se indicó anteriormente, se bloquearon con IgG humana normal y se incubaron con anticuerpo anti-sst5TMD4, anti-Ang-1, anti-Ang-2, anti-Tie-2 y anti-CgA durante una hora, seguido por el equivalente secundario AlexaFluor 647 burro-anti-cabra (DAG) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.) y un burro-anti-conejo biotinilado fue utilizado con estreptavidina-RhoX 568 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se usó Hoechst 33342 para la tinción de núcleos celulares y se analizaron las secciones en un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

7. Transfección estable del receptor truncado sst5TMD4 y péptido In1-ghrelina

Las líneas celulares BON-1 y QGP-1 fueron transfectadas de forma estable con sst5TMD4 o In1-ghrelina que contiene pCADN3.1 + vector (Life Technologies). Específicamente, las células BON-1 y QGP-1 se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos y se transfectaron con vectores de sst5TMD4, In1-ghrelina o vacíos que se

utilizaron como control negativo (condición *mock*) utilizando el reactivo de transfección de lipofectamina 2000 (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante y seleccionados por tratamiento con geneticina (Gibco, Barcelona, España). Las células transfectadas de forma estable se caracterizaron por qPCR.

8. Ensayo de proliferación de azul Alamar

La proliferación celular de líneas celulares transfectadas se midió mediante el ensayo fluorescente de azul Alamar (Life Technologies). Básicamente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.000-5.000/pocillo. Se determinó la viabilidad celular a nivel basal, a 24h y 48h mediante la medición de señal fluorescente, excitando a 560 nm y leyendo a 590 nm (Flex Station 3, Molecular Devices). Específicamente, el día de la medición, las células se incubaron durante 3h en azul alamar al 10% con medio libre de suero y, a continuación, se midió la reducción de alamar. Los resultados se expresan como porcentaje frente al control (células *mock* vs transfectadas). El medio fue reemplazado por medio fresco inmediatamente después de cada medición. En todos los casos, las células se sembraron por cuadruplicado y todos los ensayos se repitieron un mínimo de cuatro veces.

9. Ensayo de capacidad de migración

La capacidad de migración de las células transfectadas con sst5TMD4, In1-ghrelina y de la condición *mock* se evaluó mediante la técnica de cicatrización de heridas. Las células estables fueron sembradas en confluencia en placas de 6 pocillos. Las células confluentes fueron privadas de suero durante 24 h y después de la sincronización se hizo una herida utilizando una punta de pipeta estéril de 100 µl. Los

pocillos se lavaron con PBS y luego se incubaron las células durante 24 h en medio suplementado con FBS. La cicatrización de la herida se calculó como el área de un rectángulo centrado en la imagen 24h después de la lesión en comparación con el área del rectángulo inmediatamente después de hacer la herida. Se realizaron al menos tres experimentos en días independientes, en los que se adquirieron tres imágenes al azar a lo largo de la herida por pocillo.

10. Ensayo de secreción in vitro y expresión de marcadores angiogénicos

Para determinar la secreción de serotonina y VEGF, las células BON-1 y QGP-1 transfectadas de modo estable con sst5TMD4 o In1-ghrelina se sembraron en placas de 12 pocillos. A una confluencia del 70%, las células se privaron de suero y después de 24h de incubación, los medios se recogieron y se almacenaron a -20°C hasta las mediciones. La secreción de serotonina se detectó usando un kit de serotonina ELISA (ALPCO, Salem, NH, USA) y la secreción de VEGF usando un kit VEGF ELISA (Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como porcentaje de secreción de serotonina o VEGF de células transfectadas frente a las células de control (*mock*). Además, se midieron VEGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en líneas celulares mediante qPCR. Al menos cuatro experimentos se realizaron en días independientes, donde las células se sembraron por duplicado.

11. Análisis estadístico

Los resultados descriptivos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE), media \pm error estándar de la media (EEM), o mediana y mínimo/máximo, según corresponda.

Para el análisis univariante de variables cuantitativas se llevaron a cabo la prueba de Shapiro-Wilks para comprobar la normalidad, y prueba de Levene para valorar la homocedasticidad con el fin de seleccionar el test de contrastes de hipótesis apropiado.

Se utilizó el estadístico χ^2 y el test exacto de Fisher para las comparaciones de variables cualitativas. Las correlaciones de Spearman se realizaron para todas las variables cuantitativas. Las diferencias entre los grupos de variables cuantitativas se compararon mediante T de Student o U-Mann Whitney para diferencias entre dos grupos y análisis de la varianza (ANOVA) o prueba Kruskal-Wallis para diferencia entre más de dos grupos, decidiendo el uso de uno u otra prueba según el análisis de normalidad. La comparación entre las variables relacionadas se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. Las muestras de todos los grupos dentro de un experimento se procesaron al mismo tiempo.

El estudio ROC se realizó para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas. Específicamente, se utilizó como una herramienta para medir cuán bien la expresión de cada uno de los componentes del sistema de ghrelina analizados podría distinguir entre diferentes grupos de diagnóstico [resultado clínico de los pacientes (remisión del tumor, enfermedad estable o enfermedad progresiva) y malignidad (expresión en tumores primarios de pacientes que desarrollaron metástasis en comparación con aquellos que no desarrollaron metástasis)]. El análisis estadístico

de las curvas ROC se realizó calculando el Área bajo la Curva (AUC) de cada marcador y comparándolas con el AUC de la línea de referencia usando la prueba T de Student.

En el análisis global de factores pronósticos clínicos se utilizó análisis de la supervivencia y factores implicados según prueba de Mantel-Cox (Log-rank test) y regresión multivariante de Cox. La selección de predictores para elaborar un modelo de regresión con mejor ajuste global se realizó según el método de todas las ecuaciones posibles. Se consideró para esta selección valores bajos del índice de Akaike (AIC) y criterio de información bayesiana (BIC). Se realizó comprobación de supuesto de proporcionalidad graficando la función de riesgo para cada par de sujetos. Se realizó comprobación gráfica de la linealidad de los residuales de Martingale con respecto a los predictores cuantitativos introducidos en el modelo predicho para verificación de supuesto de relación log-lineal. Con el modelo seleccionado se construyó una tabla pronóstica de razones de riesgo.

Los p-valores fueron de dos colas y la significación estadística se consideró cuando $p < 0,05$. Los datos se presentan haciendo especificación para $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS versión 20.0 (IBM SPSS Statistics Inc., Chicago, IL), STATA versión 12.0 (StataCorp LLC, Texas) y GraphPad versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de cohorte de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa

La población total del registro incluye 104 pacientes con TNE diagnosticados en Hospital Universitario de la Princesa desde 1995 hasta 2016. La fecha límite para los análisis presentados en esta Tesis Doctoral fue el 31 de diciembre de 2016. Las características clínicas y patológicas de la población estudiada se resumen en la Tabla 3.

Un tercio de los pacientes presentaron enfermedad metastásica (TNM IV; n = 33) y 16 pacientes (16%) presentaron síndrome hormonal (10% de insulinoma, 4% carcinoide, 1% de Zollinger-Ellison y 1% ACTH ectópico). La localización del tumor primario en orden decreciente de incidencia fue: 39 páncreas (38%), 36 gástricos/intestino delgado (35%), 23 intestino grueso/apéndice/recto (22%) y 6 primario desconocido (6%). La clasificación de la OMS de 2010 se realizó en 67 pacientes (66% de la población total), incluyendo 34 casos G1 (51% de los clasificados), 26 casos G2 (39%) y 7 casos G3 (10%). Esta proporción varió significativamente dependiendo del grado y de la localización del tumor primario (Tabla 3).

	Total, 104 (100%)	TNE-P, 39 (37,5%)	TNE-GI, 59 (56,7%)	Desconocido, 6 (5,8%)	p-valor
Edad (años)					
Mediana (rango)	63 (13-88)	64 (27-86)	62 (28-88)	65 (13-72)	0,758
Sexo					
Masculino	49 (47,1%)	17 (43,6%)	28 (47,5%)	4 (66,7%)	0,572
Femenino	55 (52,9%)	22 (56,4%)	31 (52,5%)	2 (33,3%)	
Tumor funcional	16 (15,8%)	11 (29,7%)	4 (6,8%)	1 (20%)	0,01
Síndrome Hormonal					<0.0001
Insulinoma-Hipoglucemia	10 (9,9%)	10 (27%)	0	0	0,01
Síndrome Carcinóide	4 (4%)	0	3 (5,1%)	1 (20%)	
Síndrome Zollinger-Ellison	1 (1%)	0	1 (1,7%)	0	
Síndrome ACTH ectópico	1 (1%)	1 (2,7%)	0	0	
TNM					
I	51 (49%)	20 (51,3%)	31 (52,5%)	0	0,27
II	9 (8,7%)	3 (7,7%)	6 (10,2%)	0	
III	9 (8,7%)	2 (5,1%)	7 (11,9%)	0	
IV	33 (31,7%)	14 (35,9%)	14 (23,7%)	6 (100%)	
ND	2 (1,9%)	0	1 (1,7%)	0	
OMS 2010					
G1	34 (33,7%)	8 (21,6%)	25 (43,1%)	1 (16,7%)	0,27
G2	26 (25,7%)	11 (29,7%)	14 (24,1%)	1 (16,7%)	
G3	7 (6,9%)	2 (5,4%)	4 (6,9%)	1 (16,7%)	
ND	34 (33,7%)	16 (43,3%)	15 (25,9%)	3 (50%)	

Tabla 3. Características de la cohorte de TNE del Hospital Universitario de La Princesa (N=104 pacientes). Los porcentajes representan proporciones de las columnas. Los valores de P se calcularon a partir de las pruebas χ^2 de Pearson, excepto para la variable continua "Edad" para la cual se utilizó el análisis de la varianza. Abreviaturas: TNE-P = tumor neuroendocrino pancreático, TNE-GI = tumor neuroendocrino gastrointestinal, ND = no disponible, TNM = sistema de estadificación según ENETS, OMS = Organización Mundial de la Salud.

2. Análisis de supervivencia global y factores pronósticos de cohorte de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa

2.1 Análisis univariante

En el último seguimiento, 33 pacientes (32%) habían fallecido. Las causas de muerte fueron relacionadas a TNE (30 pacientes, 91% de todas las muertes) y otras causas no relacionadas con TNE o la terapia relacionado con TNE (3 pacientes, 9%). Con una mediana de seguimiento de 14,4 años (rango: 0-19), la tasa global de supervivencia a 5 años para la población total del estudio fue del 78,1% (IC 95%: 68-85,4) (Tabla 4).

	Supervivencia global (años)				P-valor
	n	Mediana	% a 5 años	CI 95%	
Población total	104	14,4	78,1	68,0- 85,4	-
Edad (años)					0,080
<30	3	NC	100		
30-60	44	NC	84,7	68,9-92,9	
>60	57	9,7	71,6	56,3-82,4	
Sexo					0,814
Masculino	49	15,3	76,6	60,1- 87,0	
Femenino	55	14,4	79,3	64,7- 88,3	
Síndrome Hormonal					0,433
No	85	14,4	78,1	66,3- 86,2	
Sí	16	15,3	80,0	50,0-93,1	
Origen de Tumor					0,175
Primario	39	NC	74,6	56,7- 85,9	
TNE de Páncreas	59	15,3	80,3	65,5- 89,3	
TNE gastrointestinal	6	6,6	53,3	6,80- 86,3	
Origen desconocido					
Estadio TNM					<0.01
I	51	NC	92,0	80,0- 96,9	
II	9	4,8	41,7	7,20- 74,7	
III	9	NC	77,8	36,5- 93,9	
IV	33	8,6	60,9	40,1- 76,4	
OMS 2010					<0.0001
G1	34	NC	94,0	78,2- 98,5	
G2	26	NC	77,8	50,5- 91,2	
G3	7	0,8	14,3	0,70- 46,5	

RESULTADOS

Tabla 4. Factores pronósticos de supervivencia global. IC = intervalo de confianza; NC = no calculable (categoría de referencia o mediana no alcanzada), TNM = sistema de estadificación según ENETS, OMS = Organización Mundial de la Salud. Prueba utilizada: Prueba de Mantel-Cox.

Cabe destacar que el pronóstico estaba en relación fundamentalmente con el grado tumoral [tasas de supervivencia global a 5 años para G1, G2 y G3: 94%, 78% y 14%, respectivamente (Figura 9)] y el estadio TNM (Estadio I, II, III y IV: 92%, 42%, 78% y 60%) fue un importante factor predictivo (Figura 10). Sin embargo, se decidió agrupar los estratos con ausencia de metástasis (I, II y III) o M0 y compararlos con el estadio IV o M1 debido a la heterogeneidad en los estratos intermedios II-III (Figura 11).

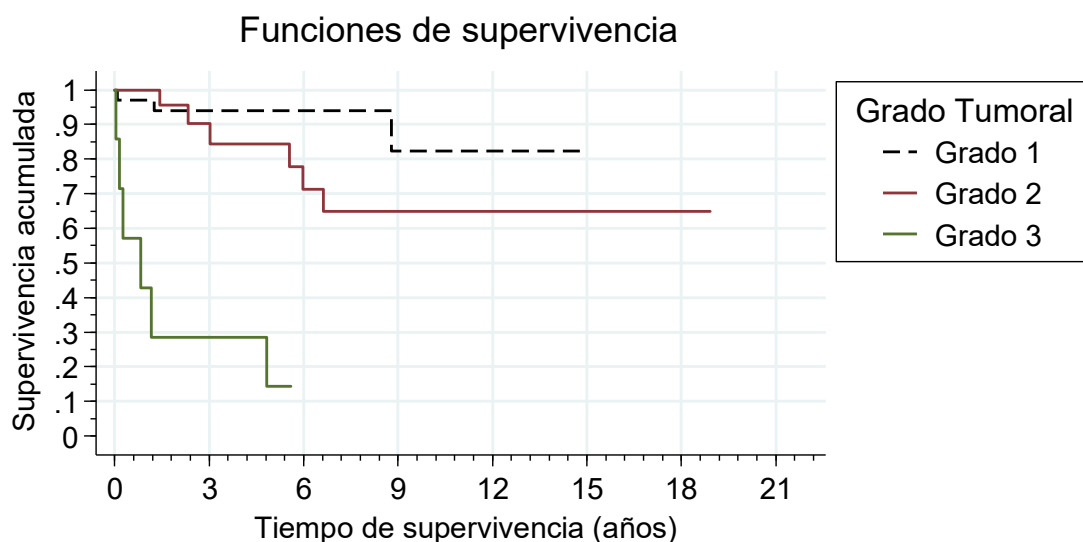


Figura 9. Supervivencia global de los pacientes con TNE por grado tumoral: Grado 1 (G1) o Ki-67 <2%, Grado 2 (G2) o Ki-67 3-20%, Grado 3 (G3) o Ki-67 > 20%.

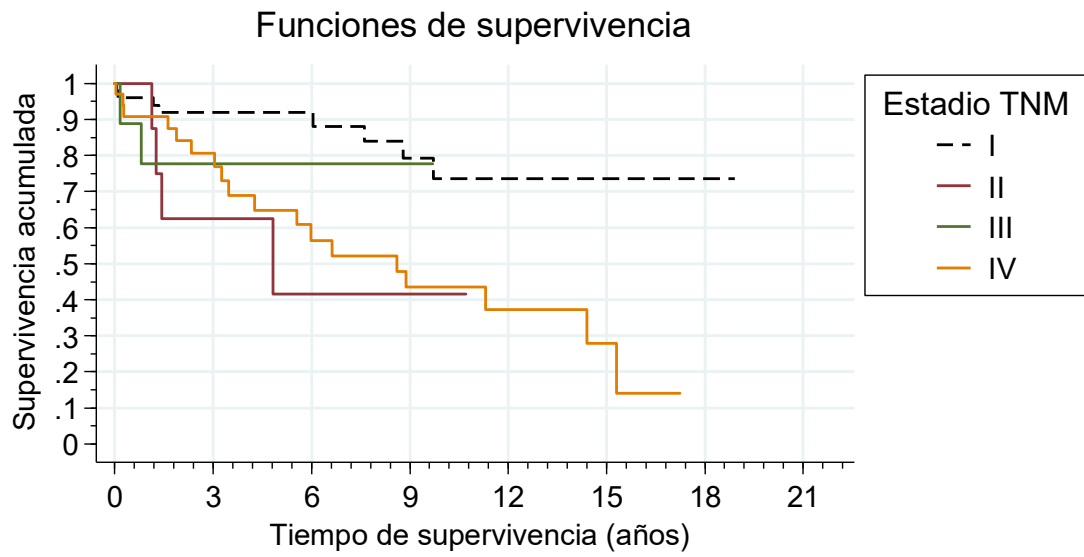


Figura 10. Supervivencia global de los pacientes con TNE según estadio TNM: I, II, III y IV.

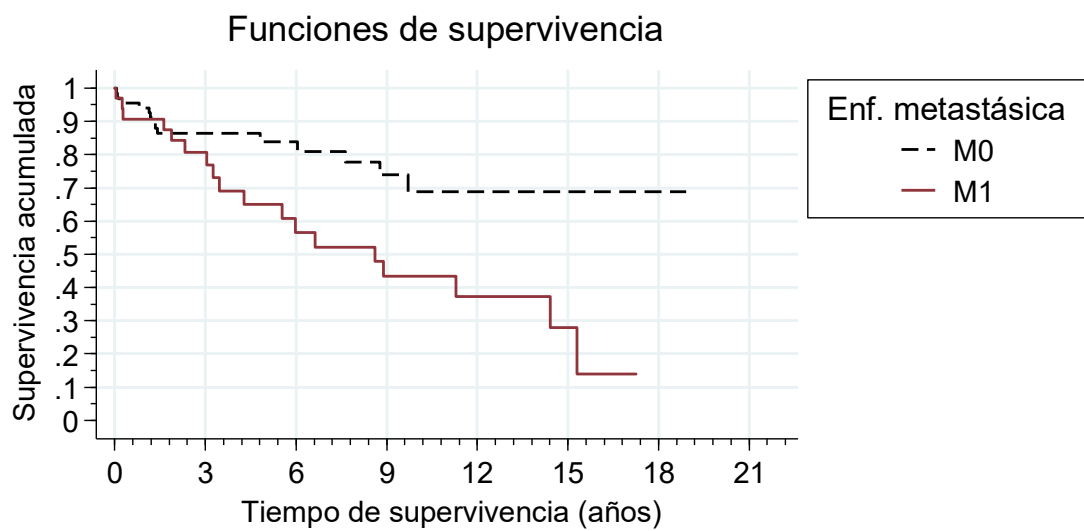


Figura 11. Supervivencia global de los pacientes según metástasis: ausencia de metástasis (estadio I, II y III agrupados o M0) y presencia de metástasis (estadio IV o M1).

RESULTADOS

2.2 Análisis multivariante

Para el modelo multivariante se tuvieron en cuenta todos los factores tanto los que habían resultado influyentes y con una $p < 0,1$ en el análisis univariante, como aquellos citados en la literatura. El análisis multivariante de Cox confirmó en el modelo máximo (Tabla 5) que la clasificación basada en la proliferación (OMS 2010) y el estadio TNM son factores pronósticos independientes de supervivencia.

Variable	Hazard ratio	IC 95%	p-valor
Edad (cada 10 años)	1,388	0,920-2,093	0,118
Sexo			
<i>Femenino</i>	Ref.	Ref.	-
<i>Masculino</i>	0,601	0,183- 1,975	0,402
Función			
<i>TNE no funcional</i>	Ref.	Ref.	-
<i>TNE funcional</i>	0,673	0,122- 3,722	0,650
Origen de tumor primario			
<i>Conocido (TNE-P o TNE-GI)</i>	Ref.	Ref.	-
<i>Desconocido</i>	0,37	0,035- 3,891	0,407
TNM estadio IV (Enf. Metastásica)			
<i>Ausencia de metástasis</i>	Ref.	Ref.	-
<i>Presencia de metástasis</i>	4,219	1,220-14,592	<0.05
OMS 2010			
<i>G1</i>	Ref.	Ref.	-
<i>G2</i>	1,809	0,419- 7,812	0,427
<i>G3</i>	43,1	7,56-245,163	<0.0001

Tabla 5. Modelo máximo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global. Abreviaturas: TNE-P = tumor neuroendocrino pancreático, TNE-GI = tumor neuroendocrino gastrointestinal, IC = intervalo de confianza, Ref. = categoría de referencia, TNM = sistema de estadificación según ENETS, OMS = Organización Mundial de la Salud.

Finalmente, se seleccionaron mediante el método de todas las ecuaciones posibles la clasificación basada en la proliferación (OMS 2010), el estadio TNM y la edad como factores pronósticos independientes de supervivencia (Tabla 6). El modelo

seleccionado fue aquel con menor Índice de información de Akaike (AIC = 91,8) y menor Criterio de información Bayesiana (BIC = 100,6) que indica un mejor ajuste global.

<i>Variable</i>	<i>Hazard ratio</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p-valor</i>
Edad (cada 10 años)	1,553	1,107-2,179	<0.05
TNM estadio IV			
Ausencia de metástasis	Ref.	Ref.	-
Presencia de metástasis	3,800	1.145-12,619	<0.05
OMS 2010			
G1	Ref.	Ref.	-
G2	1,676	0,381-7,364	0,494
G3	28,498	5,900-137,658	<0.0001

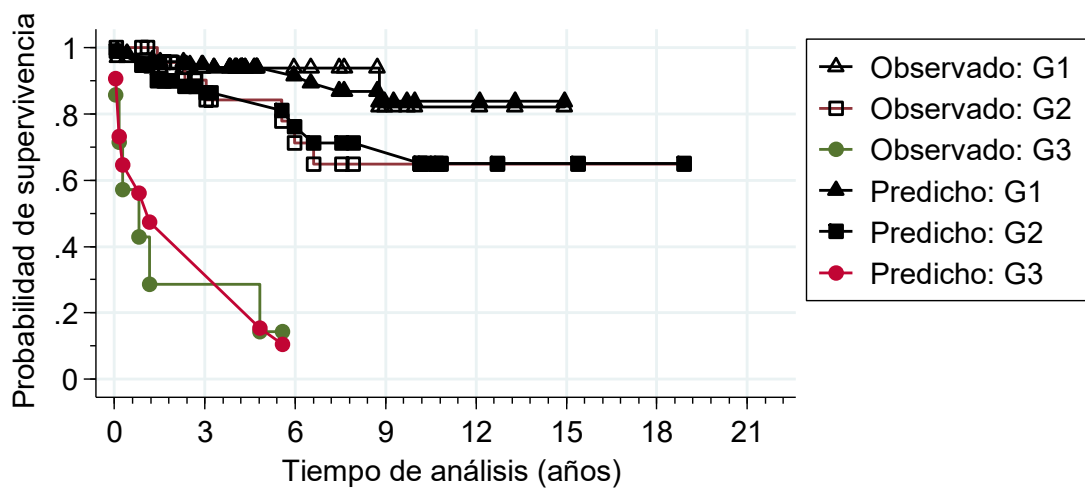
Tabla 6. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global seleccionado bajo método de todas las ecuaciones posibles. Abreviaturas: IC = intervalo de confianza, Ref. = categoría de referencia, TNM = sistema de estadificación según ENETS, OMS = Organización Mundial de la Salud.

2.3 Comprobación de supuestos en análisis multivariante de supervivencia global y factores pronósticos

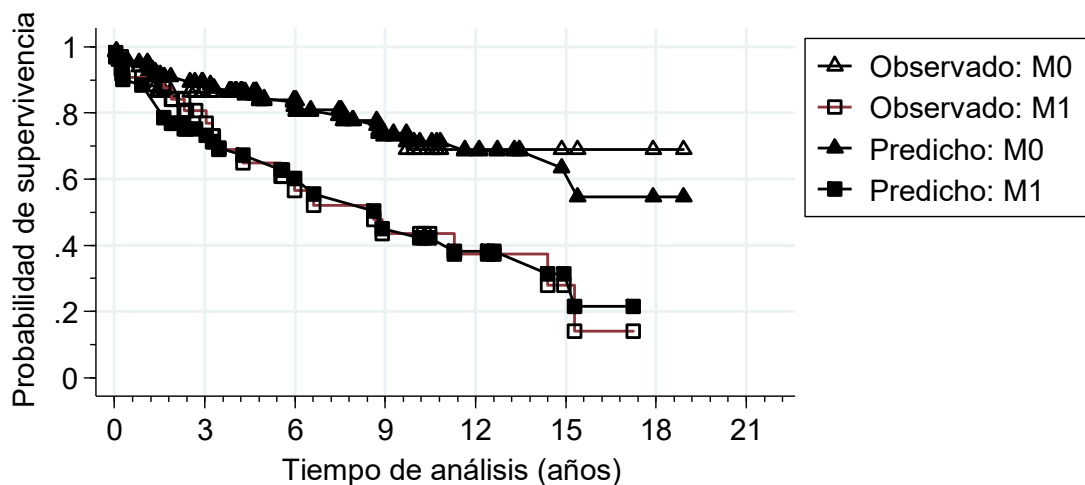
2.3.1 Supuesto de proporcionalidad

Al ajustar por las variables estadio TNM y edad se observa que se cumple el supuesto de proporcionalidad para el grado tumoral (Figura 12A), presencia o ausencia de metástasis (Figura 12B) y edad (Figura 12C).

A



B



C

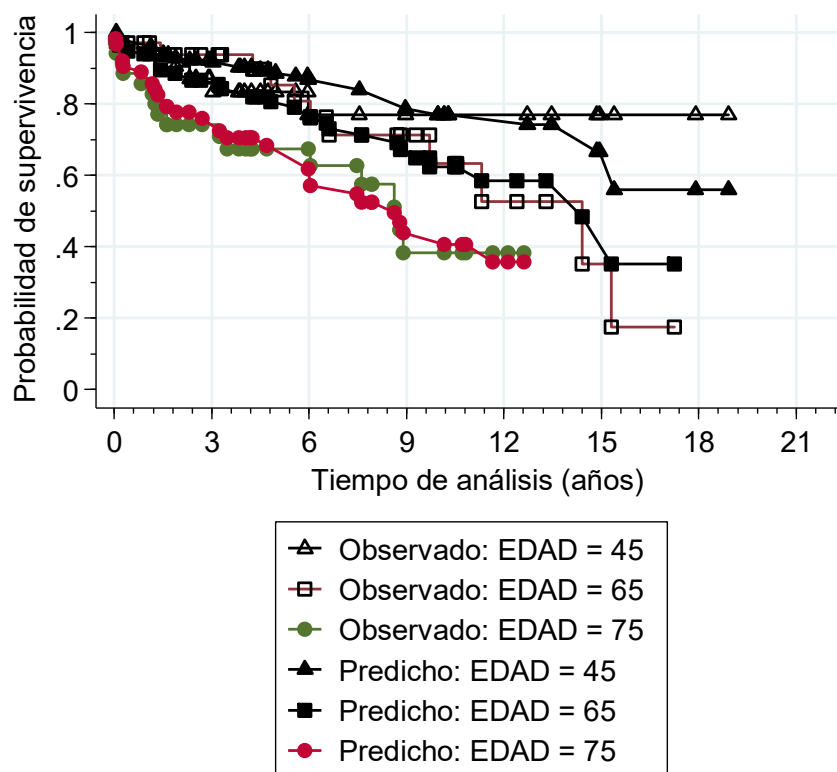


Figura 12. Comprobación gráfica de supuesto de proporcionalidad. El supuesto de proporcionalidad se cumple cuando la función de riesgo para cada par de sujetos presenta un cambio constante a lo largo del tiempo. El gráfico sugiere una alta coincidencia del riesgo según (A) el grado tumoral, (B) presencia o no de metástasis y (C) edad.

2.3.2 Supuesto de relación log-lineal

Asimismo, se comprueba que la relación entre la tasa de supervivencia y las variables explicativas del modelo sigue el supuesto de log-lineal (Figura 13). Cabe resaltar que, al valorar el método gráfico, pareciera que pacientes mayores presentan mayores cambios de riesgos en la mortalidad por cada aumento de edad y ocurre una situación inversa en los pacientes jóvenes. Sin embargo, hay pocos pacientes en estas categorías para poder realizar esta aseveración.

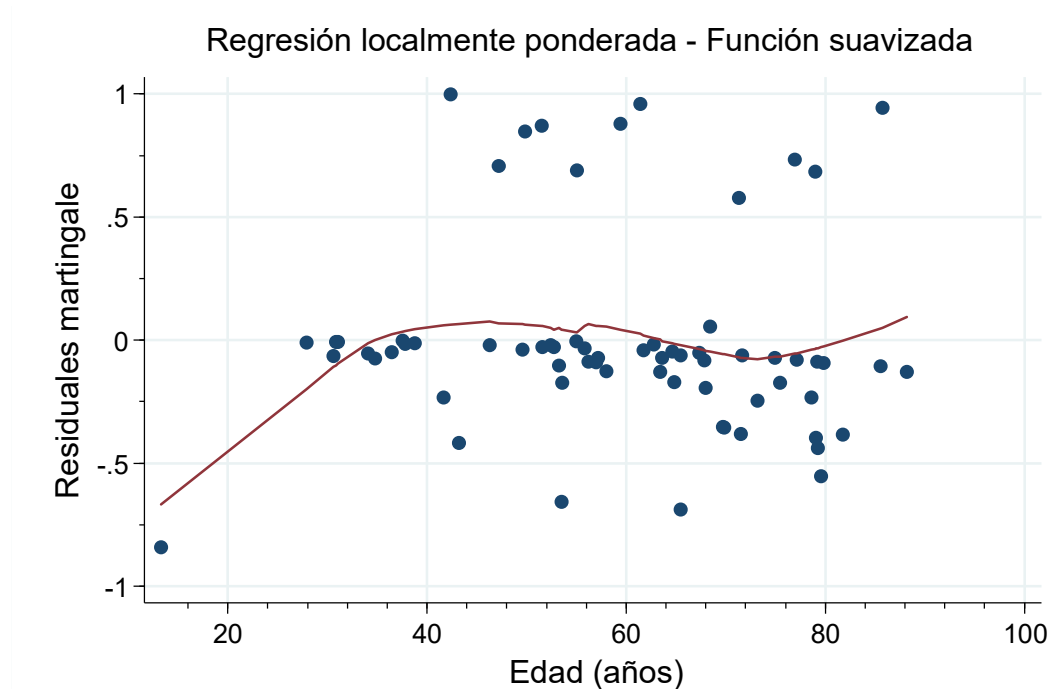


Figura 13. Comprobación gráfica de la linealidad de los residuales de Martingale con respecto a los predictores cuantitativos (Edad) introducidos en el modelo. El supuesto de relación log-lineal hace referencia a que la relación entre la tasa de supervivencia y las variables explicativas debe seguir una relación lineal.

2.4 Construcción de una tabla pronostica de razones de riesgo de cohorte de tumores neuroendocrinos en Hospital Universitario de La Princesa

Para facilitar la valoración rápida de supervivencia de un determinado paciente en un contexto clínico, se aplica el modelo predictivo seleccionado para construir una tabla con las razones de riesgo (Hazard ratio) para cada una de las combinaciones de los factores pronósticos y se comparan con la combinación de factores predictivos que confiere un menor riesgo (Tabla 7).

Estadio IV y Grado tumoral	Edad			
	30	45	60	75
Ausencia de metástasis				
G1	1,0 (ref.)	1,9	3,7	7,3
G2	1,7	3,2	6,3	12,2
G3	28,5	55,2	106,8	206,7
Presencia de metástasis				
G1	3,8	7,4	14,2	27,6
G2	6,4	12,3	23,9	46,2
G3	108,3	209,6	405,8	785,5

Tabla 7. Tabla pronostica de razones de riesgo. Puesto que la edad se ha introducido en el modelo como un predictor cuantitativo se decide categorizar para limitar el número total de combinaciones (30, 45, 60 y 75 años). Para calcular las razones de riesgo o Hazard Ratio (HR) se utiliza el riesgo más bajo como referencia, que a partir de los signos de los coeficientes del modelo de regresión se deduce que corresponde a un paciente diagnosticado antes de los 30 años, que no tiene enfermedad metastásica y clasificación basada en la proliferación G1 (OMS 2010).

3. Análisis descriptivo de cohorte seleccionada para estudio molecular

Un total de 26 pacientes con TNE-GEP se incluyeron en el estudio molecular. Trece pacientes (50%) presentaron tumores pancreáticos (7 no funcionantes, 5 insulinomas y 1 ACTH ectópico) y los otros 13 TNE gastrointestinales. Un total de 15 pacientes presentaron metástasis, la mayoría de ellos en los ganglios linfáticos regionales y/o en el hígado. La CgA prequirúrgica se determinó en 22 pacientes, con un valor medio de $19,7 \pm 21,2$ nmol/L (mediana 15,3 (0-77) nmol/L, rango de referencia 0-6 nmol/L). Se realizó determinación de ácido 5-hidroxi-indolacético prequirúrgico en 8 pacientes, con un valor medio de $17,2 \pm 17,6$ mg/24 h (mediana 7,8 (2-42) mg/24 h, intervalo de referencia 2-10 mg/24 h). La tinción con inmunoperoxidasa para CgA y sinaptofisina fue positiva en todos los tejidos tumorales. Se observó un nivel de inmunoreactividad Ki-67 > 2% en 7 de las 14 muestras disponibles (índice medio de Ki 67 $10,7 \pm 23,3\%$, mediana 2,5 (2-90) %). Un resumen detallado de las características clínicas y patológicas de los pacientes incluidos en este estudio se muestra en la Tabla 8.

Id	S	E	Tipo	TNM	Grado OMS	Metástasis (Localización)	CgA (nmol/L)	5-HIAA U (mg/24h)	Octreoscan	ASS	Seg
1	F	34	P	IIA	G2		ND	-	Negativo	-	NR
2	F	41	P	IIIB	-	GR	0	-	Negativo	-	NR
3	F	67	P	I	-		0	-	-	-	NR
4	F	53	I	IIA	-		ND	-	-	-	NR
5	F	76	P	IV	-	GR, H	5	4	Positivo	+	ER
6	M	38	I	IV	-	GR, H	0	42	Positivo	+	ER
7	F	78	P	IV	-	GR, H	33	-	Positivo	+	ER
8†	M	58	P	IV	-	GR, H, P	33	3	Positivo	+	ER
9	F	78	I	IV	G1	GR, H	6	-	Positivo	+	ER
10	M	41	I	IV	G2	H	3	2	Negativo	+	ER
11	F	71	P	I	G1		6	-	Negativo	-	NR
12†	F	57	I	IV	G2	GR, H, PU, HU	59	32	Positivo	+	ER
13	M	58	I	IV	G1	GR, H	77	-	Positivo	+	ER
14	F	73	P	IV	G2	H	18	-	Negativo	+	ER
15	M	54	I	IV	G2	GR, H	15	12	Negativo	+	ER
16†	F	66	I	IIIB	-		1	4	Negativo	-	NR
17	F	44	I	IIIB	G1		15	-	-	-	NR
18	M	58	I	IIIB	G1	GR	1	-	-	-	NR
19	M	63	I	IV	G1	GR, H	18	-	Positivo	+	ER
20†	M	85	P	I	G3		8	-	-	-	NR
21	M	79	P	I	-		22	-	Positivo	-	NR
22†	F	51	I	IV	-	GR, H	46	-	Positivo	+	ER
23	F	49	P	I	G1		22	-	-	-	NR
24	M	43	P	IIIB	-		46	-	-	-	NR
25	F	44	P	I	G2		ND	-	-	-	NR
26	M	58	I	IV	-	GR, H	ND	40	Positivo	+	ER

Tabla 8. Características clínicas prequirúrgicas de los 26 pacientes con TNE-GEP. Abreviaturas:

S: sexo; E: edad; TNM = sistema de estadificación según ENETS; G: grado tumoral; OMS = Organización Mundial de la Salud; CgA: cromogranina A; 5-HIAA U: ácido 5-hidroxi-indolacético urinario; ASS: análogo de somatostatina; M: masculino; F: femenino; P: TNE pancreático; I: TNE gastrointestinal; GR: ganglio regional; H: hígado; P: peritoneo; PU: pulmón; HU: hueso; Seg: seguimiento; ND: no disponible; †: paciente fallecido durante seguimiento; NR: enfermedad no residual; ER: enfermedad residual.

4. Expresión de los sistemas reguladores SST/CORT en los TNE-GEP y su relación con marcadores angiogénicos como marcadores de malignidad

4.1 Los receptores SST y las variantes truncadas están sobreexpresados en TNE-GEP

Se observó una expresión aumentada en TNE-GEP de sst1 en 80,8% de los casos, sst2 en 92,0%, sst3 en 56,0%, sst4 en 68,0% y sst5 en 68,0% a nivel de ARNm mediante qPCR (Tabla 9). El subtipo de receptor sst1 tenía la expresión más alta en TNE-GEP, seguido por sst2> sst4> sst3. Se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de sst1, sst2 y sst3 en tejidos tumorales en comparación con tejidos no tumorales adyacentes ($3,88 \pm 2,23$ frente a $0,02 \pm 0,01$; $0,62 \pm 0,08$ frente a $0,24 \pm 0,08$ y $0,09 \pm 0,02$ vs. $0,04 \pm 0,02$, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de sst4 y sst5 entre el tumor y las muestras no tumorales (Figura 14). Curiosamente, la expresión de los subtipos truncados sst5TMD4 y sst5TMD5 se detectó en 25 y 19 casos, respectivamente, de las 26 muestras tumorales evaluadas (96,2% y 73,1%, respectivamente), mientras que el análisis de estos receptores en el tejido no tumoral adyacente sólo evidenció una expresión detectable en 65,5% y 17,2% de los casos, respectivamente (Tabla 9). Asimismo, la expresión de los subtipos truncados a nivel de ARNm era superior en los tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales ($0,15 \pm 0,05$ vs $0,08 \pm 0,05$, $p < 0,01$ para sst5MD4, y $0,011 \pm 0,005$ vs $0,0006 \pm 0,0004$, $p < 0,001$ para sst5TMD5) (Figura 14).

	Tejido tumoral	Tejido no tumoral adyacente
sst1	21/26 (80,8)	14/28 (50.0)
sst2	23/26 (92.0)	17/28 (60.7)
sst3	14/25 (56.0)	12/26 (46.2)
sst4	17/25 (68.0)	14/26 (53.8)
sst5	17/25 (68.0)	13/26 (50.0)
sst5TMD4	25/26 (96.2)	19/29 (65.5)
sst5TMD5	19/26 (73.1)	5/29 (17.2)
SST	22/26 (84.6)	19/26 (61.5)
CORT	16/24 (66.7)	14/25 (56.0)

Tabla 9. Muestras de tumor primario (%) en las que se detectaron receptores de somatostatina.

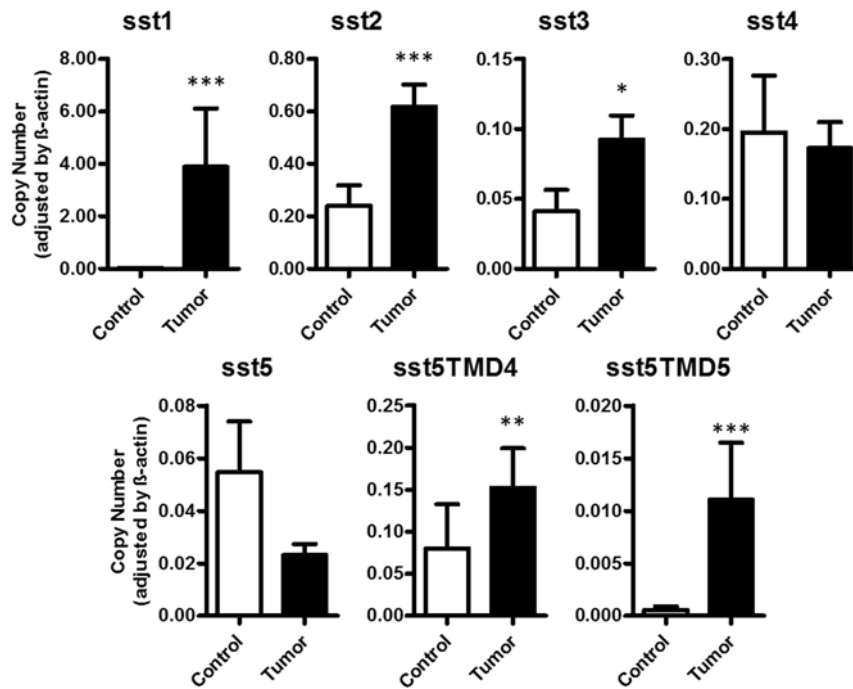


Figura 14. Expresión de receptores de somatostatina en TNE-GEP y tejidos adyacentes no tumorales. Los receptores de somatostatina canónicos (sst1-5) y truncados (sst5TMD4 y sst5TMD5) se midieron mediante qPCR en un conjunto de TNE-GEP incluyendo tejido primario y metastásico. Los valores representan la media \pm EEM de los valores absolutos de ARNm, ajustados por β -actina. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el tumor y los tejidos adyacentes no tumorales (p-valores para la prueba T: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

RESULTADOS

No se encontraron diferencias estadísticas entre el tejido normal procedente de controles sanos y el tejido "normal" adyacente en la vecindad de la TNE (Figura 15). El análisis inmunohistoquímico de secciones seriadas de muestras de páncreas normales (sanas) confirmó que los islotes pancreáticos normales (teñidos para CgA) no mostraron una tinción específica para sst5TMD4 (Figura 16).

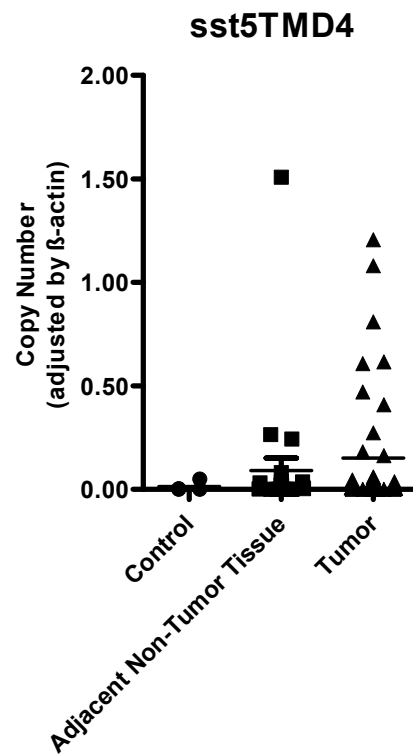


Figura 15. Expresión de sst5TMD4 en tejido no tumoral adyacente en comparación con tejidos normales. Los receptores sst5TMD4 se midieron mediante qPCR en un conjunto de tejidos adyacentes no tumorales en comparación con tejidos normales. Los valores (ajustados por β -actina) se representan mediante una gráfica de puntos.

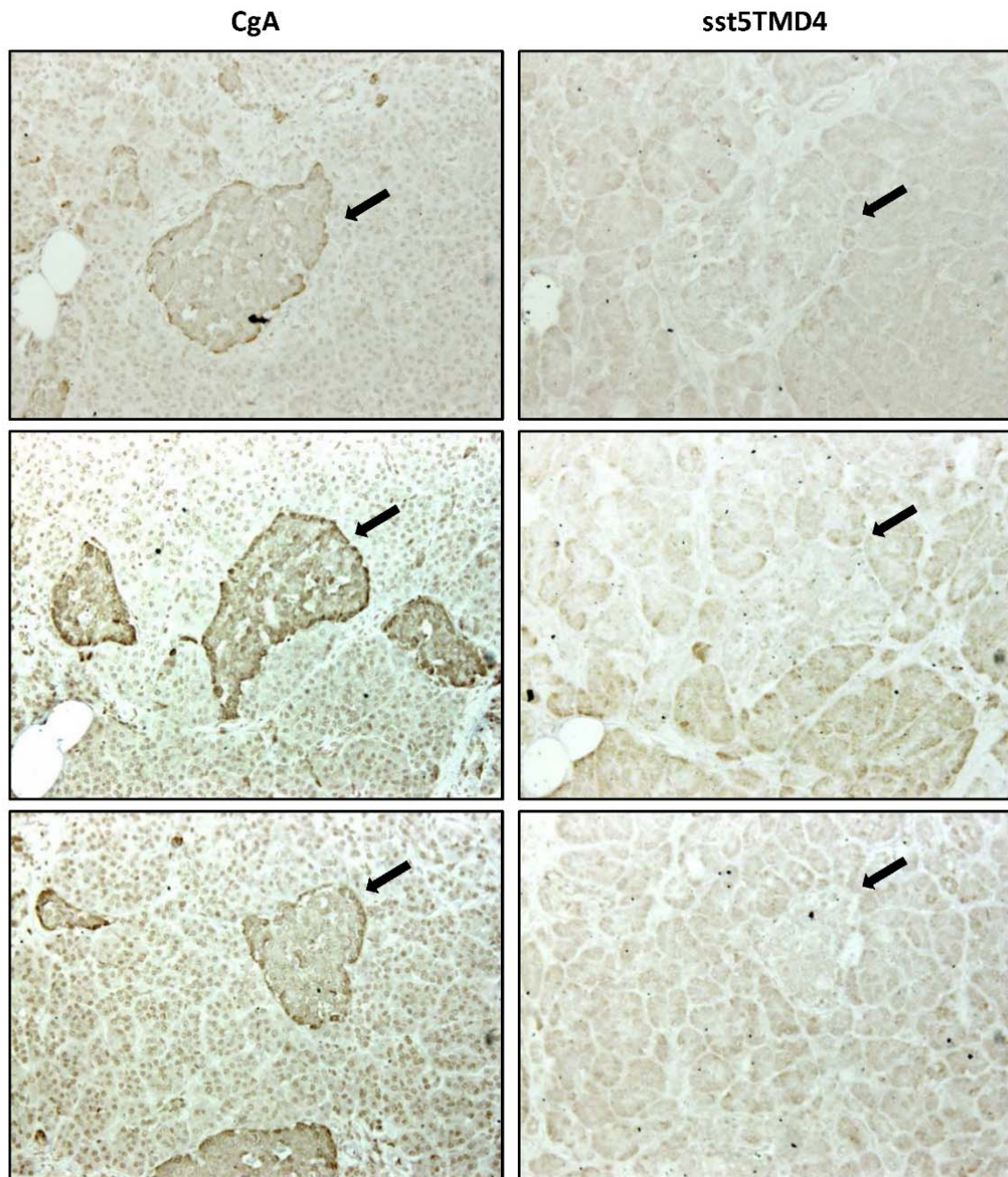


Figura 16. Tinción inmunohistoquímica de 3 muestras de páncreas normal (sano) para cromogranina A (CgA) y receptor truncado sst5TMD4. Cada fila representa un control proveniente de un paciente diferente. Aumento original $\times 200$. Las flechas indican los islotes pancreáticos teñidos para CgA pero negativos para sst5TMD4.

RESULTADOS

Finalmente, la expresión de SST y CORT se detectó en 66,7% y 56,0% de los tejidos tumoral y no tumoral respectivamente (Tabla 9), pero no se encontraron diferencias significativas en su expresión entre ambos (Figura 17).

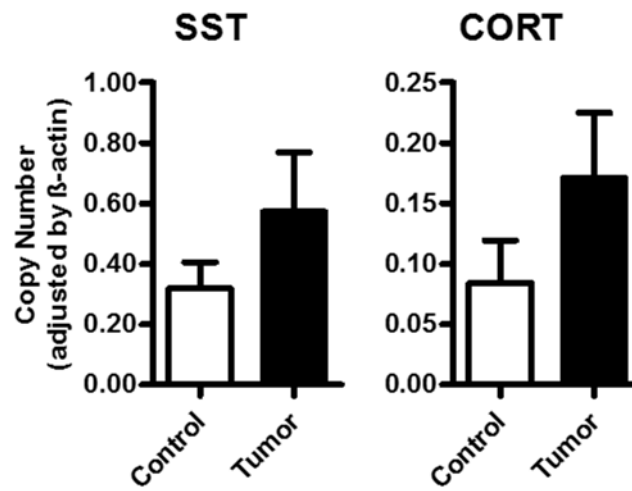
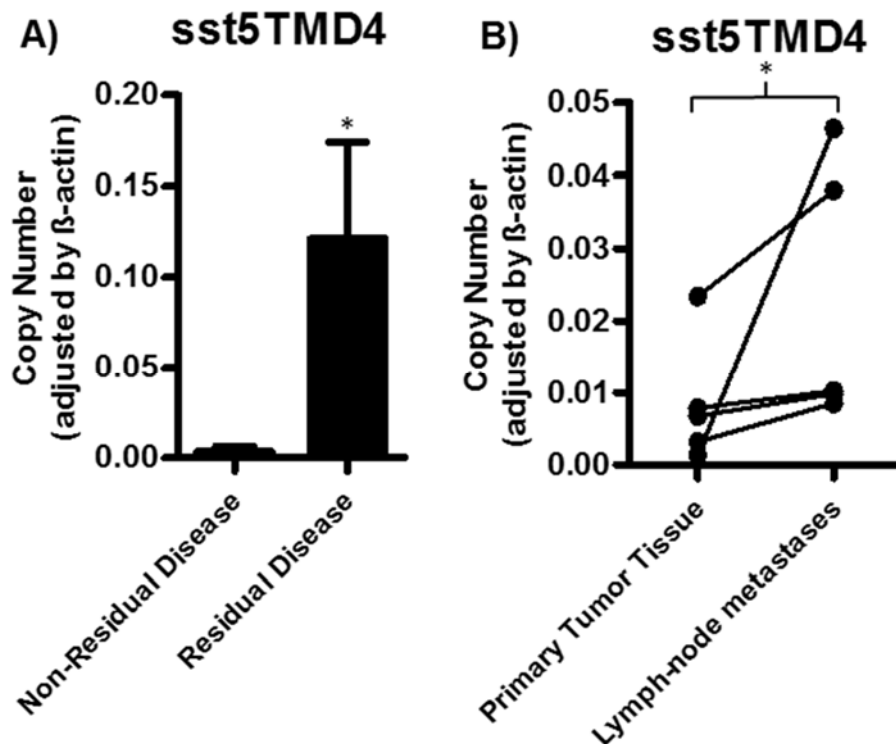


Figura 17. Expresión de SST y CORT en TNE-GEP y tejido adyacente no tumoral. SST y CORT se midieron por qPCR en un conjunto de TNE-GEP, incluyendo el tejido primario y metastásico. Los valores representan la media \pm SEM de los valores absolutos de ARNm, ajustados por β -actina.

4.2 sst5TMD4 se asocia a características malignidad en TNE-GEP y en líneas celulares transfectadas

Los tejidos tumorales de origen gastrointestinal de pacientes con enfermedad residual analizados por qPCR exhibieron una mayor expresión de sst5TMD4, en comparación con los tumores de pacientes con enfermedad no residual (Figura 18A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en este sentido en los tumores de origen pancreático. Además, un análisis comparativo de los subtipos sst y sus variantes en las biopsias evaluadas por pares de los tejidos tumorales de la localización del tumor primario con respecto a tejido metastásico de los mismos pacientes reveló una expresión aumentada de sst5TMD4 en las metástasis de los ganglios linfáticos, en comparación con su tumor primario original correspondiente. (Figura 18B). En contraste, no hubo diferencias en la expresión de los receptores sst canónicos entre las metástasis a distancia y su correspondiente tumor primario ($p > 0,05$, 5 pares analizados).



RESULTADOS

Figura 18. La expresión de sst5TMD4 se asocia a una mayor malignidad en pacientes con TNE-GEP. (A) niveles de expresión de ARNm de sst5TMD4 en muestras tumorales de origen gastrointestinal. Los pacientes se clasificaron de acuerdo al estado de enfermedad en enfermedad no residual y residual. Los valores representan la media \pm EEM de los valores absolutos de ARNm, ajustados por β -actina. (B) Análisis pareado de la expresión de sst5TMD4 en el tejido tumoral primario (primary tumor tissue) y metástasis de ganglios linfáticos (lymph-node metastases) de los mismos pacientes. Los valores absolutos de los niveles de ARNm se determinaron mediante qPCR y se ajustaron mediante β -actina. 1 fue un tumor intestinal y 4 fueron pancreáticos. Los asteriscos indican diferencias significativas (p-valores para la prueba T: * p <0,05).

La expresión de SST, CORT y ssts tanto canónico y truncado se analizó también en las líneas de células BON-1 y QGP-1 por qPCR, que se aceptan comúnmente como modelos útiles para los estudios de células de TNE (Figura 19). Consistente con su origen de un somatostatinooma humano, la expresión de SST fue elevada en células QGP-1 en comparación con la de CORT, pero esto no fue el caso de las células BON-1 (Figura 19A). Al analizar los diferentes subtipos receptores, se observó que sst5 mostró la mayor expresión en ambas líneas celulares, mientras que BON-1 presentaron niveles moderados de sst1 y sst3 (Figura 19A). Curiosamente, ambas líneas celulares exhibieron niveles bajos de sst2 (Figura 19A). Cabe destacar que los receptores truncados no eran detectables en ninguna de estas líneas celulares (Figura 19A). Por lo tanto, para evaluar el impacto potencial de sst5TMD4 en las características de malignidad en TNE, se indujo su sobreexpresión en las líneas celulares QGP-1 y BON-1 por un vector de transfección. La qPCR de las células transfectadas confirmó la transfección exitosa en ambas líneas celulares, donde se detectó un número elevado de copias de ARNm de sst5TMD4 (Figura 19B y 19C - primer panel desde la izquierda) Usando estas células como modelo, se observó que la tasa de proliferación a 48 horas fue significativamente mayor en células BON-1 transfectadas con sst5TMD4 (Figura 19B

- segundo panel) en comparación con los controles. En contraste, no se encontraron diferencias en la tasa de proliferación entre las células control negativas QGP-1 (*mock*) y las transfectadas con sst5TMD4. En concordancia con este hallazgo, se observó un aumento significativo en la expresión de Ki67 en células BON-1 transfectadas con sst5TMD4, pero no en células QGP-1 transfectadas (Figura 19B y 19C - tercer panel). Otros ensayos funcionales revelaron que la presencia de sst5TMD4 indujo cambios similares en ambas líneas celulares en cuanto a su agresividad, ya que se pudo observar que las células transfectadas con sst5TMD4, exhibían mayor capacidad de migración (Figura 19B y 19C - cuarto panel). Además, la capacidad funcional de ambas líneas celulares transfectadas con sst5TMD4 fue mayor, con un aumento de la secreción de serotonina en comparación con las células de control (Figura 19B y 19C - quinto panel).

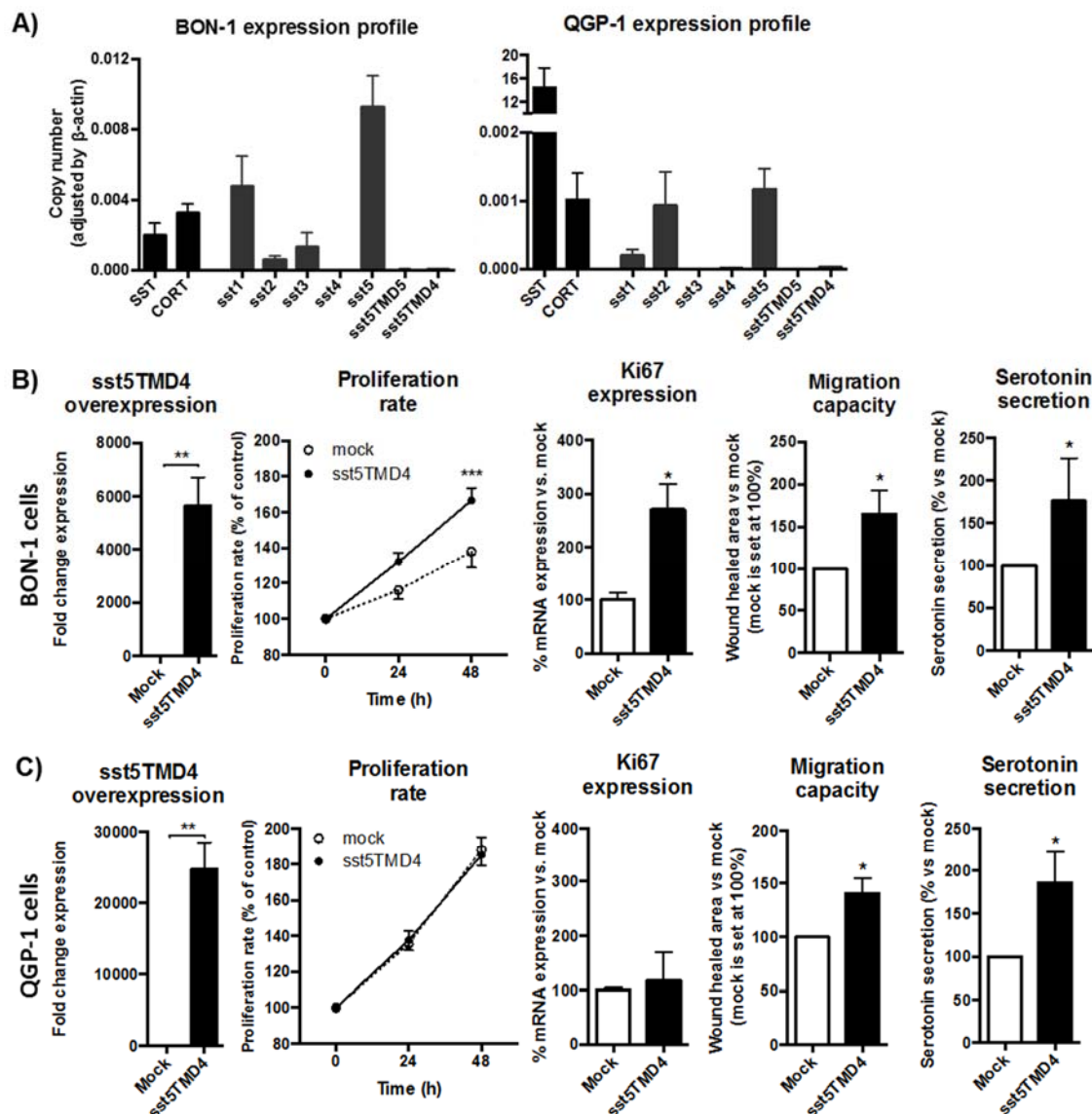


Figura 19. La presencia de sst5TMD4 se asocia a características de malignidad en las líneas celulares de TNE. (A) Niveles normalizados de expresión de SST, CORT y sst en líneas celulares BON-1 y líneas celulares QGP-1. Ensayos funcionales en líneas de células BON-1 transfectadas con sst5TMD4 (B) y líneas celulares QGP-1 (C), en comparación con células de control (condición *mock*). Orden de paneles de izquierda a derecha: Sobreexpresión de sst5TMD4 (*sst5TMD4 expression*); Tasa de proliferación (*proliferation rate*); Expresión de Ki67 (*Ki-67 expression*); Capacidad de migración (*migration capacity*); Y secreción de serotonina (*serotonin secretion*). Los valores representan la media \pm error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas (p-valores para la prueba T: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.3 La expresión de receptores truncados se correlaciona con la expresión de marcadores angiogénicos en pacientes con TNE-GEP

El análisis específico de ARNm de marcadores angiogénicos confirmó la presencia de Ang-1, Ang-2, Tie-2 y VEGF en TNE-GEP (Figura 20). Además, la inmunohistoquímica con anticuerpos específicos en los tejidos en parafina, evidenció positividad para Ang-1, Ang-2, Tie-2 y sst5TMD4 en cortes seriados de tejidos procedentes de TNE pancreáticos y gastrointestinales (Figura 21A). Se evaluó mediante método de puntuación inmunohistoquímica (IHS) la presencia del receptor truncado sst5TMD4 y marcadores de angiogénesis de 16 muestras tumorales (14 tejidos primarios y 2 metastásicos). Se encontró alta expresión de sst5TMD4 en 50% (7/14) de los tejidos primarios y 100% (2/2) de los tejidos metastásicos. Los valores medianos de IHS fueron 100 (rango 0-300) para sst5TMD4, 208 (70-300) para Ang-1, 185 (60-270) para Ang-2 y 189 (80-285) para Tie-2. Estos resultados fueron corroborados por estudios de inmunofluorescencia triple (Figura 21B). Se observó la co-expresión de sst5TMD4 (Figura 21B – segunda y tercera fila desde la parte superior) y CgA en células tumorales neuroendocrinas, pero no en las células no tumorales adyacentes (Figura 21B – cuarta fila). Además, también se evidenciaron la co-expresión de sst5TMD4 y de los diferentes marcadores angiogénicos en células neuroendocrinas (Figura 21B - sexta fila).

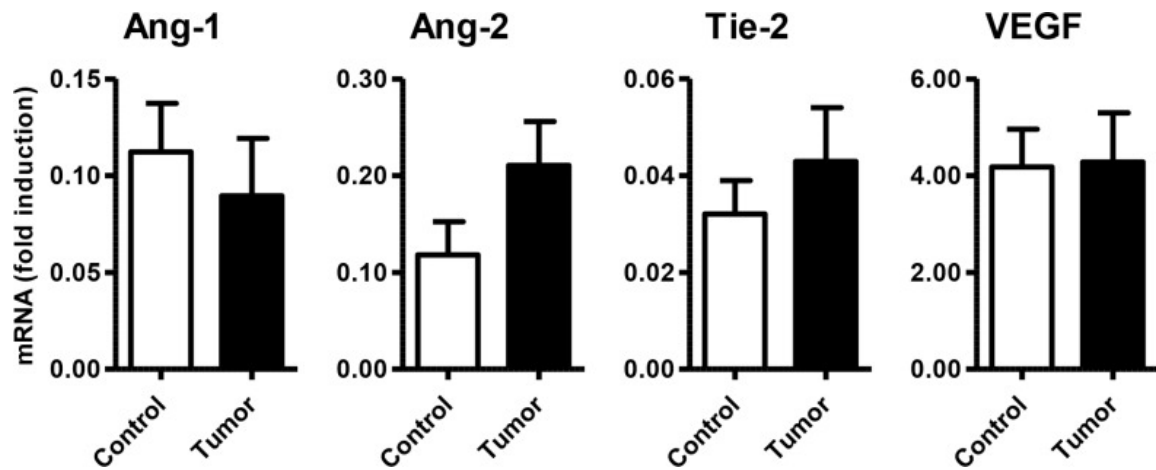


Figura 20. Expresión de marcadores angiogénicos en TNE-GEP y tejido adyacente no tumoral.

La expresión de ARNm (fold induction) de Ang-1, Ang-2, Tie-2 y VEGF se midió mediante qPCR en un conjunto de TNE-GEP, incluyendo tejido primario y metastásico. Los resultados se normalizaron de acuerdo con el valor de β -actina. Los valores representan la media \pm error estándar de la media.

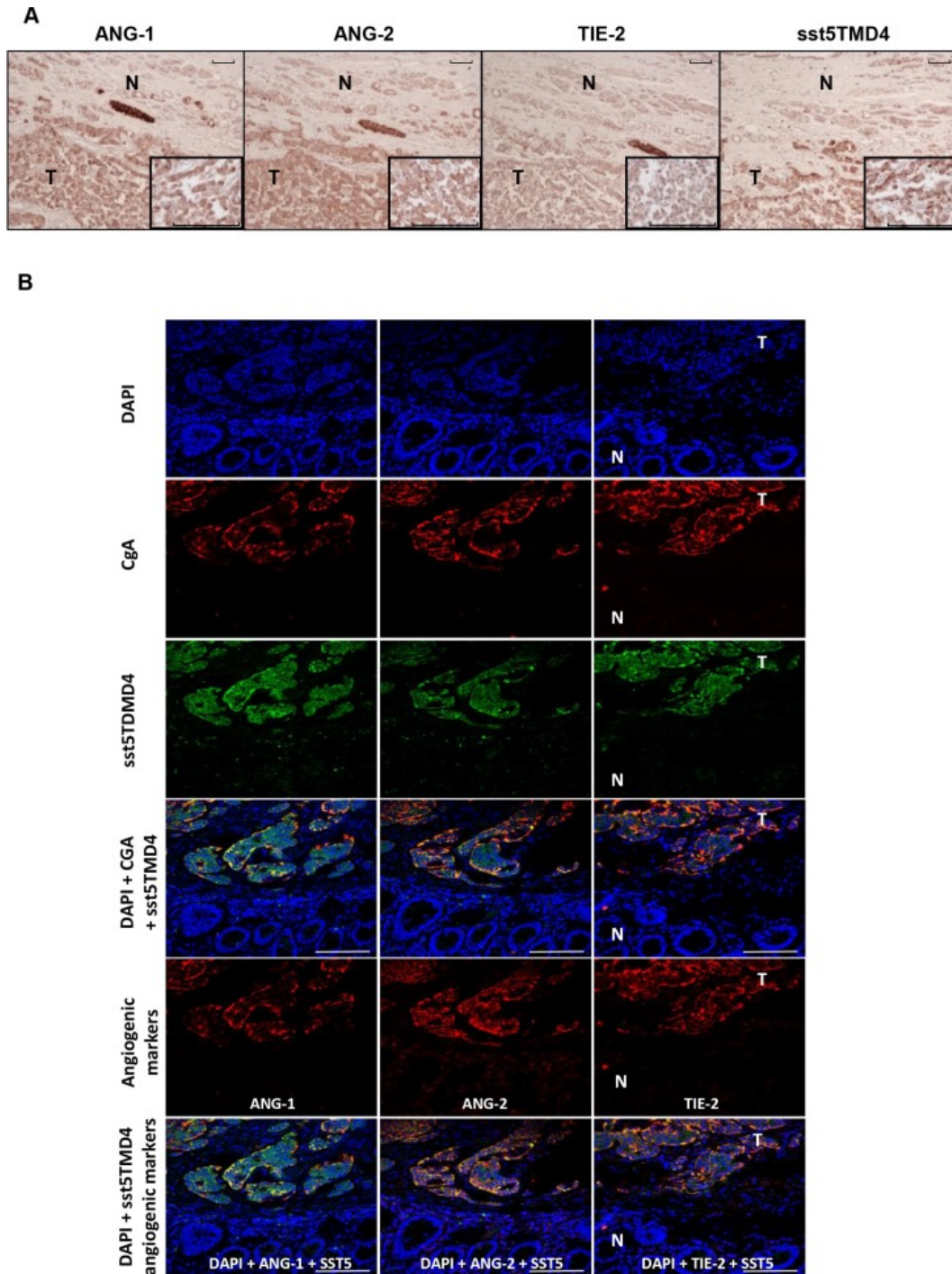


Figura 21. Expresión de sst5TMD4 y co-localización con marcadores angiogénicos en TNE-GEP. (A) Análisis de la expresión de moléculas angiogénicas (angiogenic markers) y sst5TMD4 mediante inmunohistoquímica en cortes seriados de TNE pancreático. Aumento original $\times 100$ y $\times 400$. N: tejido normal; T: tejido tumoral. CgA: cromogranina. (B) Expresión de sst5TMD4 y moléculas angiogénicas por inmunofluorescencia triple en una muestra de TNE gastrointestinal. Aumento original $\times 400$. N: tejido normal; T: tejido tumoral. La barra de escala para 100 μm se representa con una línea para cada figura.

RESULTADOS

El análisis de correlaciones (Rho de Spearman) en tejidos tumorales reveló correlaciones positivas significativas entre los cuatro marcadores angiogénicos y una correlación negativa de cada uno de ellos con los subtipos de receptores sst3 y sst4. Además, Ang-1, Ang-2, Tie-2 y VEGF estaban directamente y significativamente correlacionados con sst5TMD4, y Tie-2 mostró esta relación también con sst5TMD5 (Figura 22 - parte inferior izquierda de la tabla). Por el contrario, en las pocas muestras de tejido no tumoral adyacente en las que se detectaron sst5TMD4 y VEGF, se observaron correlaciones positivas sólo entre Ang-1 y Ang-2 y VEGF con Ang-1 y sst5TMD4 (Figura 22 – parte superior derecha de la tabla).

En vista de estos resultados, se determinó la expresión de estos factores pro-angiogénicos y la secreción de VEGF en células BON-1 y QGP-1 transfectadas con sst5TMD4. Como se muestra en la Figura 23, la sobreexpresión de sst5TMD4 en ambas líneas celulares no aumentó la expresión de factores proangiogénicos (VEGF, Ang-1 o Ang-2) o la liberación de VEGF al medio de cultivo.

Non-tumor adjacent tissues

	CORT	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5	sst5TMD5	sst5TMD4	Ang-1	Ang-2	Tie-2	VEGF	
CORT	,315	,199	,246	,335	,251	,457"	-,277	,226	,368	,166	-,475	,252	SST
sst1		,603"	,551"	,676"	,579"	,653"	,203	-,080	,068	-,240	-,328	,127	CORT
sst2			,585"	,802"	,692"	,614"	-,236	-,152	-,009	-,036	-,025	,017	sst1
sst3				,793"	,670"	,572"	-,180	,159	,179	-,363	-,165	,064	sst2
sst4					,808"	,680"	-,180	-,064	-,048	-,258	-,266	,004	sst3
sst5						,692"	-,056	-,250	,045	-,282	-,130	-,048	sst4
sst5TMD5							,150	,023	,019	-,264	-,206	,158	sst5
sst5TMD4								-,322	-,151	-,142	-,262	-,345	sst5TMD5
Ang-1									,358	,333	-,101	,506"	sst5TMD4
Ang-2										,553"	,277	,659"	Ang-1
Tie-2											,199	,205	Ang-2
VEGF												,358	Tie-2

Tumor tissues



RESULTADOS

Figura 22. Heat-Map para correlaciones entre la expresión de los sistemas de SST y la angiogénesis (Rho de Spearman). Las correlaciones negativas significativas se muestran en rojo y las correlaciones positivas significativas en verde. Triángulo inferior izquierdo muestra correlaciones en los tejidos tumorales (tumor tissue) y triángulo superior derecho muestra correlaciones en los tejidos no tumorales adyacentes (non-tumor adjacent tissues). En muestras de tumores, SST y CORT mostraron una correlación positiva significativa con sst1-5, y estos subtipos de receptores de SST estaban positivamente correlacionados entre sí de una manera significativa. sst5TMD4 mostró una correlación positiva con SST y sst1, y sst5TMD5 con sst1. También se encontró una correlación positiva entre los cuatro marcadores angiogénicos y una correlación negativa entre cada uno de ellos con sst3 y sst4. Ang-1, Ang-2, Tie-2 y VEGF estuvieron positivamente correlacionado con sst5MD4. El análisis de las correlaciones en los tejidos no tumorales adyacentes mostró resultados similares respecto a CORT y sst1-5. Sin embargo, SST se correlacionó solo con sst5, y no se observó correlación entre los receptores truncados y marcadores de angiogénesis. Los asteriscos marcan los valores de p significativos (* P <0,05, ** p <0,01, dos caras).

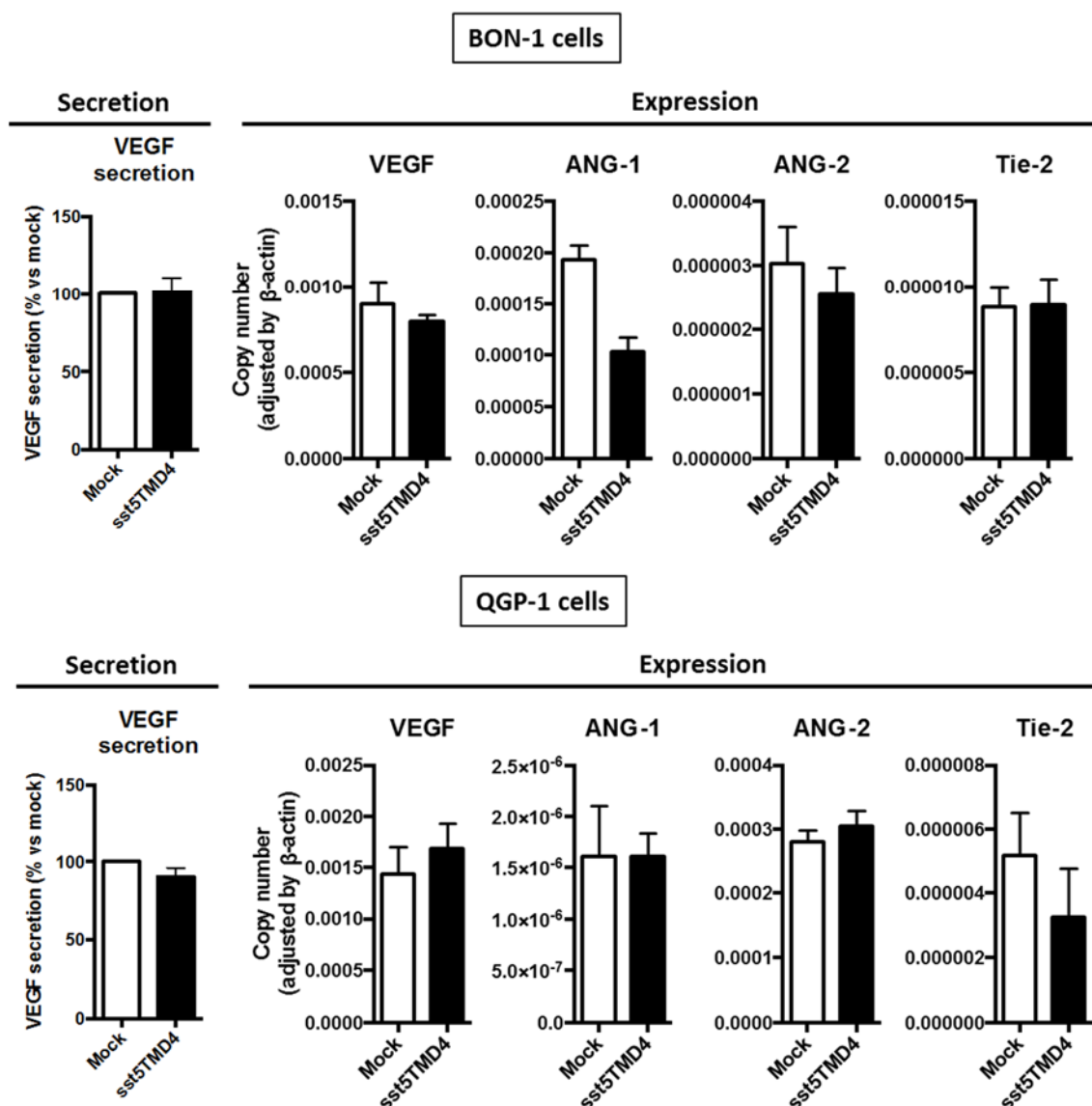


Figura 23. La secreción de VEGF y factores pro-angiogénicos en líneas celulares transfectadas de forma estable con sst5TMD4. Las líneas celulares BON-1 y QGP-1 se utilizaron para determinar el efecto de sst5TMD4 en la secreción VEGF (por ELISA) y expresión de factores pro-angiogénicos (VEGF, Ang-1, Ang-2 y Tie-2) por qPCR. Los valores representan la media \pm error estándar de la media.

5. Expresión del sistema ghrelina en los TNE-GEP como marcadores de malignidad

5.1 Los componentes del sistema de la ghrelina se sobreexpresan en TNE-GEP

El análisis de qPCR realizado en muestras de tejido TNE-GEP reveló que la ghrelina nativa se expresaba en 35,7% (n = 15/42), su receptor GHSR1a en 88,1% (n = 37/42) y la enzima GOAT en 85,7% (n = 36/42) de los casos (Tabla 10). Curiosamente, encontramos una alta expresión de las variantes de splicing del sistema de ghrelina en TNE-GEP. Específicamente, la variante In1-ghrelina se expresó en más muestras de TNE-GEP que la ghrelina nativa [81% (n = 34/42) frente a 35,7% (n = 15/42); p <0,001, Tabla 10). De manera similar, aunque la variante truncada GHSR1b se expresó en un porcentaje similar a GHSR1a en tejidos de TNE-GEP [92,9% (n = 39/42) frente a 88,1% (n = 37/42)]. Asimismo, los niveles de expresión de la variante GHSR1b del receptor truncado fueron significativamente más elevados que la expresión de GHSR1a (p <0,001, tabla 10).

	GOAT	Ghrelina	In1-ghrelina	GHSR1a	GHSR1b
Control	22/30 (73.3%) 0.259 ± 0.077	6/30 (20.0%) 0.003 ± 0.002	15/30 (50.0%) 0.008 ± 0.003	8/25 (32.0%) 0.093 ± 0.063	21/30 (70.0%) 0.409 ± 0.111
Tumor	36/42 (85.7%) 0.3499 ± 0.055	15/42 (35.7%) 0.0028 ± 0.002	34/42 (80.9%) 0.0384 ± 0.007	37/42 (88.1%) 0.2158 ± 0.097	39/42 (92.9%) 1.764 ± 0.400

Tabla 10. Porcentaje (%) de los tejidos normales de control y tejidos de TNE que expresan los componentes del sistema de ghrelina y el número medio de copias de ARNm de cada componente ± EEM (ajustado por expresión de β-actina)

Se observó una notable desregulación de los patrones de expresión de varios componentes del sistema de ghrelina en TNE-GEP en comparación con los tejidos adyacentes no tumorales. Mientras que los niveles medios de ARNm de ghrelina nativa no fueron diferentes entre muestras tumorales y no tumorales adyacentes (Figura 24A),

encontramos que los niveles de expresión media de GHSR1a, GOAT, y también de las variantes de splicing, In1-ghrelina y GHSR1b, fueron significativamente mayores en los tejidos de TNE-GEP en comparación con el tejido no tumoral de regiones adyacentes (Figura 24). Curiosamente, los niveles de expresión de ARNm de In1-ghrelina, pero no los de ghrelina nativa, se correlacionaron fuertemente con los de GOAT en TNE-GEP (Figura 25A). Además, mientras que la expresión de GHSR1a no se correlacionó con la de ghrelina o In1-ghrelina, si se encontró que la expresión de GHSR1b era paralela a la de In1-ghrelina, pero no a la de ghrelina nativa (Figura 25B). Además, los niveles de expresión GHSR1b y GOAT se correlacionaron positivamente en los tumores (Figura 25C).

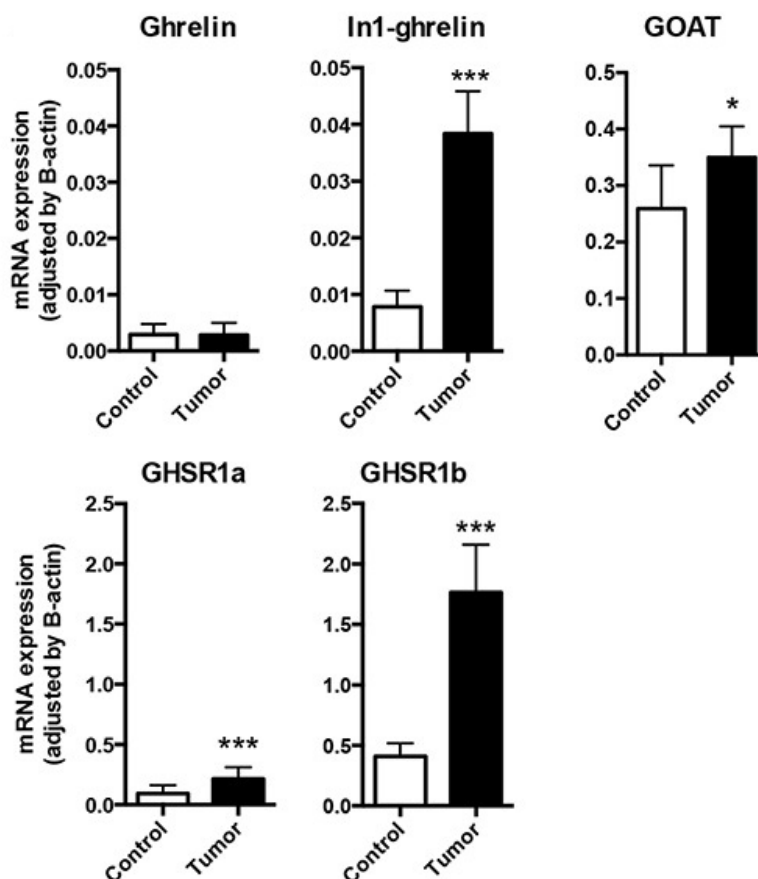


Figura 24. Expresión de los componentes del sistema de ghrelina en TNE-GEP. Los niveles de expresión de ARNm de los componentes del sistema de ghrelina (ghrelina, In1-ghrelina, GOAT, GHSR1a y GHSR1b) se determinaron mediante qPCR en una batería de TNE y se compararon con sus tejidos adyacentes no tumorales de control.

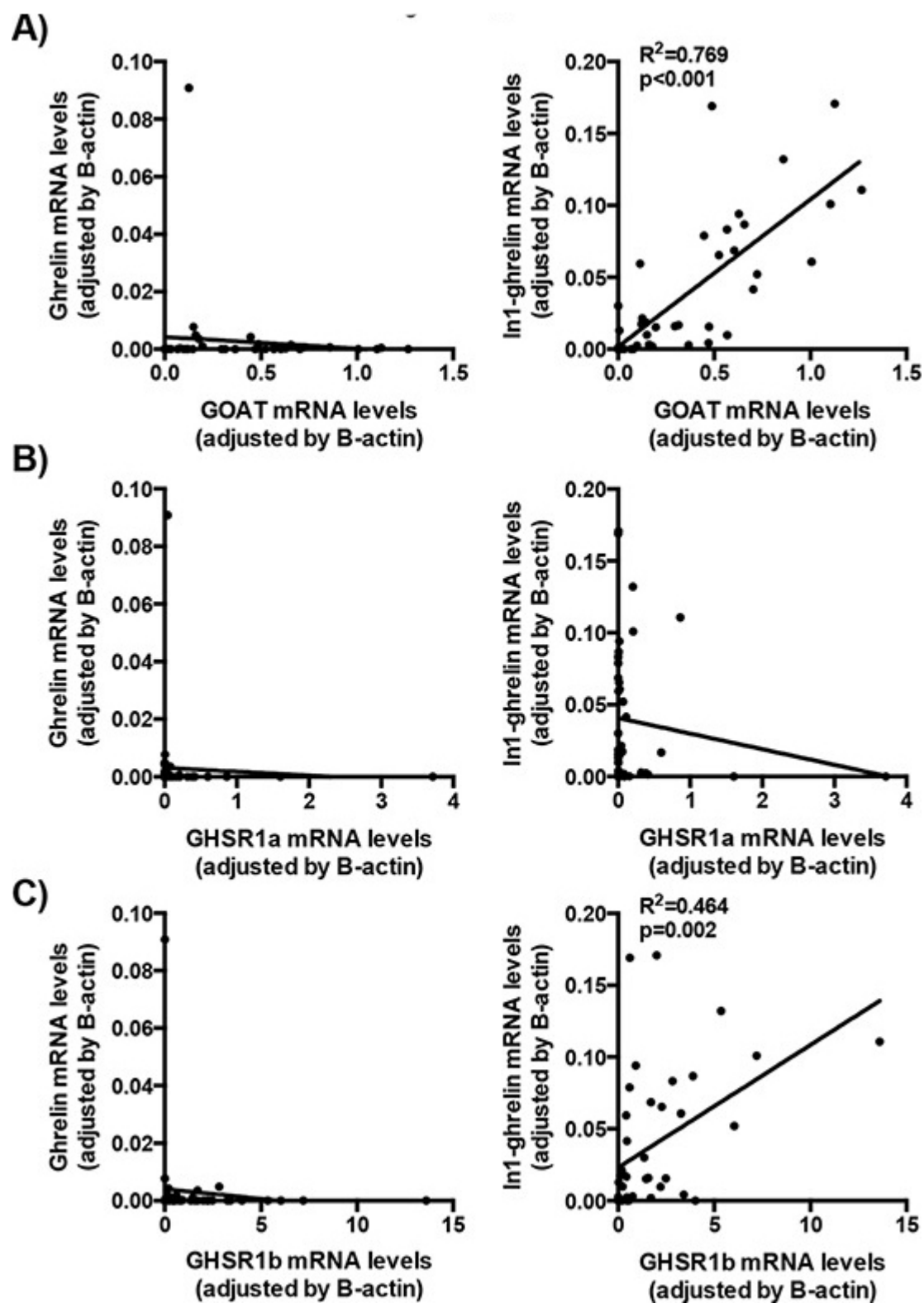
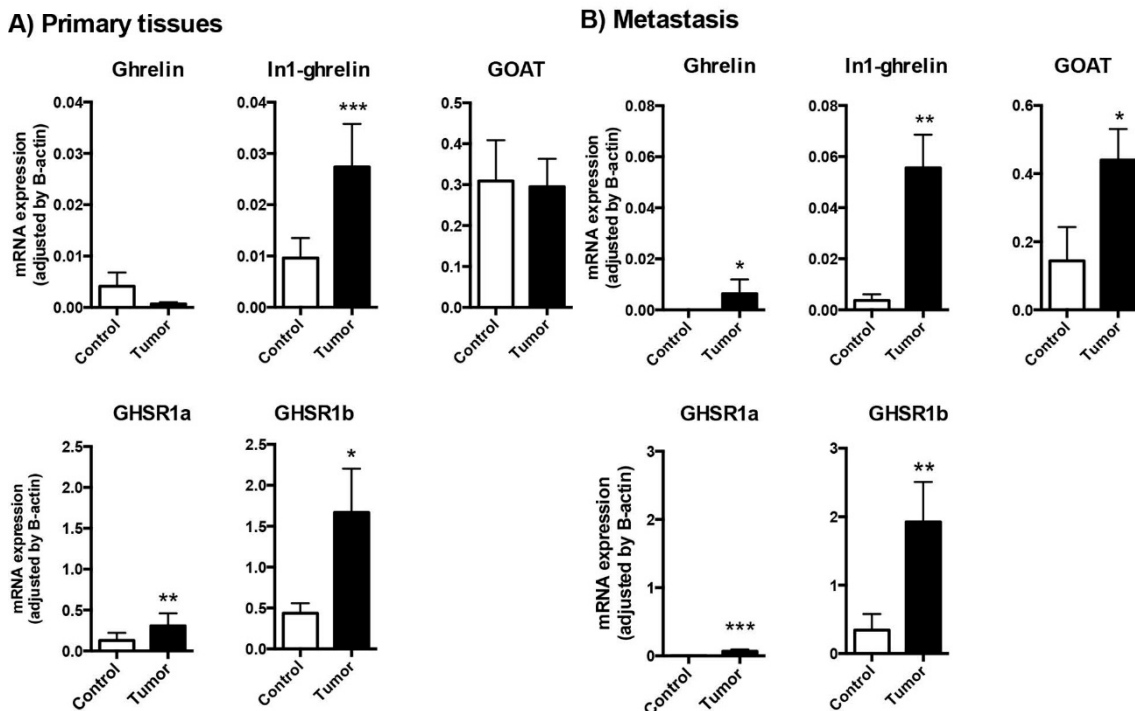


Figura 25. Correlación de los componentes del sistema de ghrelina en TNE-GEP. (A) Correlación entre los niveles de ghrelina o In1-ghrelina y los niveles de expresión de GOAT en las muestras TNE. Correlación entre los niveles de ghrelina o In1-ghrelina y GHSR1a (B) o GHSR1b (C) en las muestras TNE. Los datos representan la media \pm EEM. Los asteriscos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) indican valores que difieren significativamente de los tejidos adyacentes no tumorales control.

En el subanálisis de la expresión de los componentes de la ghrelina según las diferentes localizaciones tumorales (tejidos primarios o metastásicos) se demostró un aumento consistente de In1-ghrelina, así como de los dos receptores de ghrelina (GHSR1a y GHSR1b) en ambas categorías, mientras que sólo los niveles de expresión GOAT y la ghrelina nativa estaban elevados exclusivamente en los tejidos metastásicos, pero no en el tumor primario (Figura 26).



RESULTADOS

Figura 26. Expresión de los componentes del sistema de ghrelina en TNE-GEP de acuerdo a muestra primaria o metastásica. (A) Los niveles de expresión de ARNm de los componentes del sistema de ghrelina (ghrelina, In1-ghrelina, GOAT, GHSR1a y GHSR1b) se determinaron mediante qPCR en los TNE primarios y se compararon con sus tejidos adyacentes no tumorales de control. (B) Los niveles de expresión de ARNm de los componentes del sistema de ghrelina (ghrelina, In1-ghrelina, GOAT, GHSR1a y GHSR1b) se determinaron mediante qPCR en metástasis de TNE y se compararon con sus tejidos adyacentes no tumorales control. Los datos representan la media \pm EEM. Los asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) indican valores que difieren significativamente de los tejidos control adyacentes no tumorales.

5.2 La expresión de In1-ghrelina, GOAT y GHSR1b está asociada a peor pronóstico

Los pacientes se agruparon en tres categorías según su resultado clínico (remisión completa del tumor, enfermedad estable o enfermedad progresiva) y se evaluó la relevancia del aumento de los niveles de expresión observados para algunos de los componentes del sistema de ghrelina. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión media de ghrelina nativa y GHSR1a entre los tres grupos (Figura 27A). Por el contrario, los niveles más altos de ARNm de GOAT, In1-ghrelina y GHSR1b se asociaron a un peor resultado clínico (Kruskal-Wallis de un solo sentido: $p = 0,014$, $p = 0,004$ y $p = 0,014$, respectivamente; Figura 27A). Estas diferencias fueron particularmente evidentes cuando se compararon muestras de tumores de pacientes con remisión completa y aquellos con enfermedad progresiva (mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunn: $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,05$, Figura 27A). De hecho, el análisis ROC de todos los componentes del sistema de ghrelina mostró que la expresión de GOAT, GHSR1b y, especialmente, In1-ghrelina, discriminó entre las categorías de resultados clínicos (Figura 27B). Por el contrario, la expresión nativa de ghrelina y GHSR1a mostró una escasa capacidad para distinguir entre los dos grupos diagnósticos (curvas ROC similares a la línea de referencia). Es importante destacar que, como se ilustra en las figuras 27A y 27B, la expresión de la variante In1-ghrelina fue el mejor marcador para distinguir entre pacientes que presentaban remisión completa, enfermedad estable o enfermedad progresiva (enfermedad residual). Además, los niveles de expresión de In1-ghrelina, pero no los de GOAT o GHSR1b, también fueron significativamente más altos en muestras tumorales de pacientes con enfermedad estable, en comparación con aquellos con remisión completa de la enfermedad ($p < 0,05$; Figura 27A). En conjunto, estos hallazgos invitan a la hipótesis de que In1-ghrelina podría servir como un potencial marcador molecular diagnóstico/pronóstico y/o una herramienta para identificar nuevos objetivos

RESULTADOS

terapéuticos para el tratamiento de TNE-GEP y, por tanto, podría ser explotado en futuros estudios.

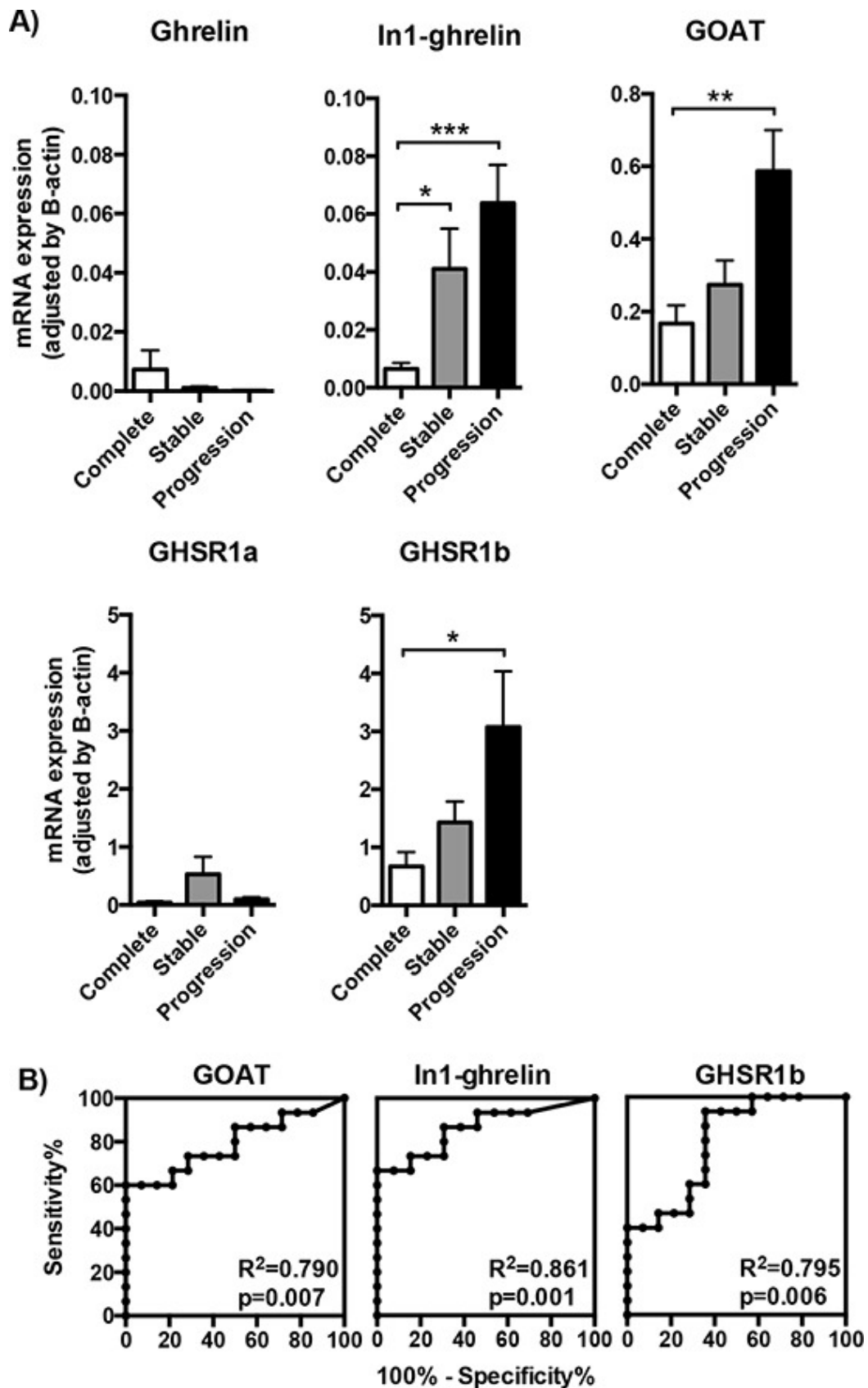
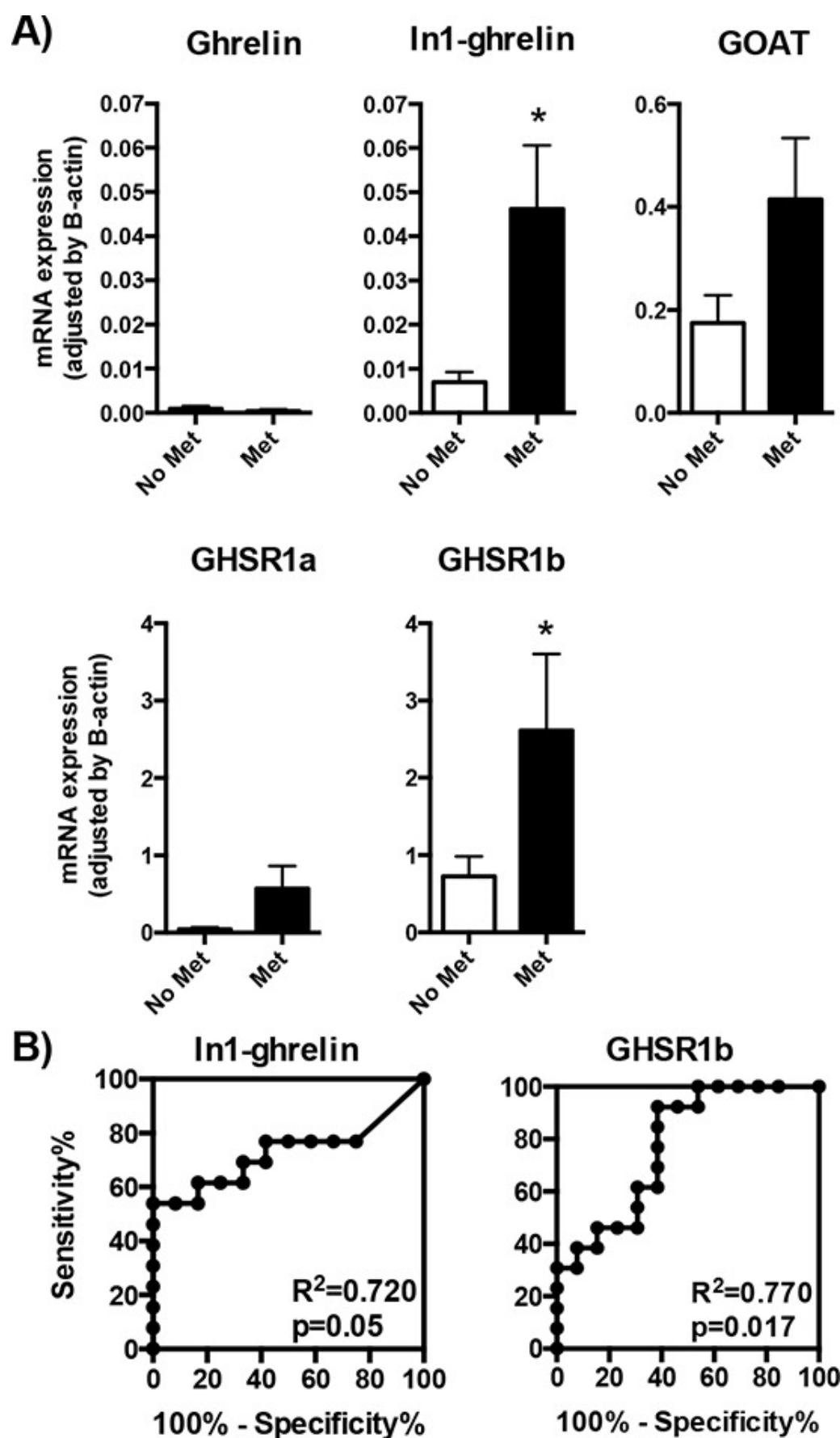


Figura 27. Niveles de expresión de ARNm de los componentes del sistema de ghrelina (ghrelina, In1-ghrelina, GOAT, GHSR1a y GHSR1b) determinados por qPCR en las muestras tumorales en función del resultado del paciente (remisión completa, enfermedad estable o progresión del tumor). (B) Análisis de curvas operador receptor (ROC) para determinar la exactitud como prueba diagnóstica de los componentes del sistema de ghrelina (GOAT, In1-ghrelina y GHSR1b, para discriminar entre TNE con ausencia o presencia de enfermedad residual [cuanto más cercana esté la curva ROC a la parte superior izquierda de la gráfica (es decir, mayor sensibilidad y especificidad), mayor será la precisión general del marcador utilizado]. Los datos representan la media \pm EEM. Los asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) indican valores que difieren significativamente de los TNE con ausencia de enfermedad residual o remisión completa.

5.3 La expresión de las variantes de splicing del sistema de ghrelina, especialmente In1-ghrelina, se asocia con características de malignidad en pacientes con TNE-GEP

Posteriormente se exploraron posibles asociaciones entre los niveles de expresión de los componentes del sistema de ghrelina en las muestras tumorales de TNE-GEP y las características clínicas, anatómicas y patológicas de los pacientes. Curiosamente, se encontró que sólo los niveles de expresión de las variantes de splicing del sistema ghrelina, In1-ghrelina y GHSR1b, estaban significativamente más elevadas en los tumores primarios de los pacientes que desarrollaron metástasis, en comparación con aquellos que no presentaban enfermedad metastásica (Figura 28A). De hecho, aunque se observaron tendencias similares, pero no estadísticamente significativas para la expresión de GHSR1a y GOAT (Figura 28A), el análisis ROC confirmó que sólo la expresión de las variantes de splicing de In1-ghrelina y el receptor GHSR1b podían discriminar entre estas dos situaciones (desarrollo de metástasis vs no metástasis, Figura 28B).

Debido a que la expresión de la variante In1-ghrelina fue consistentemente elevada en todos los tipos TNE-GEP (tejidos primarios y de metástasis) y que estaba asociada a los niveles de expresión de GOAT y GHSR1b en tejidos de TNE-GEP, consideramos de gran interés explorar el posible rol de la In1-ghrelina en la fisiopatología de estos tumores, especialmente teniendo en cuenta el hecho de que esto no se observó para la ghrelina nativa en la cohorte analizada.



RESULTADOS

Figura 28. Expresión de los componentes del sistema de ghrelina en los tejidos primarios de TNE con o sin metástasis. (A) Los niveles de expresión de ARNm de los componentes del sistema de ghrelina (ghrelina, In1-ghrelina, GOAT, GHSR1a y GHSR1b) determinados por qPCR en las muestras tumorales se clasificaron en función de la presencia o ausencia de metástasis. (B) Análisis de curva de curvas operador receptor (ROC) para determinar la exactitud de los componentes del sistema de ghrelina (In1-ghrelina y GHSR1b) como prueba diagnóstica para discriminar entre las capacidades metastásicas de los TNE. Los datos representan la media \pm EEM. Los asteriscos (* $p < 0,05$) indican valores que difieren significativamente de los TNE sin metástasis.

5.4 La sobreexpresión de In1-ghrelina se asocia con características de agresividad en células TNE humanas

Para examinar los posibles efectos funcionales de la variante In1-ghrelina en características de agresividad de TNE se utilizaron las líneas celulares BON-1 y QGP-1 (Figura 29). Los análisis realizados en ambas líneas celulares revelaron que la mayoría de los componentes del sistema ghrelina se expresaban, en diferentes niveles, excepto para GHSR1a (es decir, su expresión estaba bajo el límite de detección) (Figura 29A). En particular, la In1-ghrelina era el componente del sistema de la ghrelina más expresado en células QGP-1, seguido por ghrelina nativa, GOAT, y GHSR1b (Figura 29A). Por el contrario, la ghrelina nativa y GOAT fueron los componentes más expresados del sistema de ghrelina en las células de BON-1, seguido de la expresión de In1-ghrelina, y por un nivel de expresión de GHSR1b mucho más bajo (Figura 29B).

Seguidamente se indujo sobreexpresión de In1-ghrelina en ambas líneas celulares por mediante un vector de transfección. Se verificó la transfección exitosa de In1-ghrelina en ambas líneas celulares (Figuras 29C y 29D; primer panel desde la izquierda). Esta estrategia reveló que la sobreexpresión de In1-ghrelina aumentó la tasa de proliferación de BON -1, pero no de células QGP-1, en comparación con sus correspondientes células de control (Figuras 29D y 29C, respectivamente; segundo panel). De acuerdo con este hallazgo, también se detectó un aumento significativo en la expresión del marcador de proliferación Ki67 en las células BON-1, pero no en las células QGP-1 (Figuras 29D y 29C, respectivamente; tercer panel). Curiosamente, ensayos funcionales adicionales revelaron que la sobreexpresión de In1-ghrelina estimuló significativamente la capacidad de migración de ambas células QGP-1 y BON-1, según se evaluó mediante la técnica de cicatrización de heridas (Figuras 29C y 29D: cuarto panel). Además, la sobreexpresión de In1-ghrelina también aumentó significativamente la secreción de serotonina en ambas líneas celulares en comparación con sus correspondientes células de control (Figuras 29C y 29D: quinto panel).

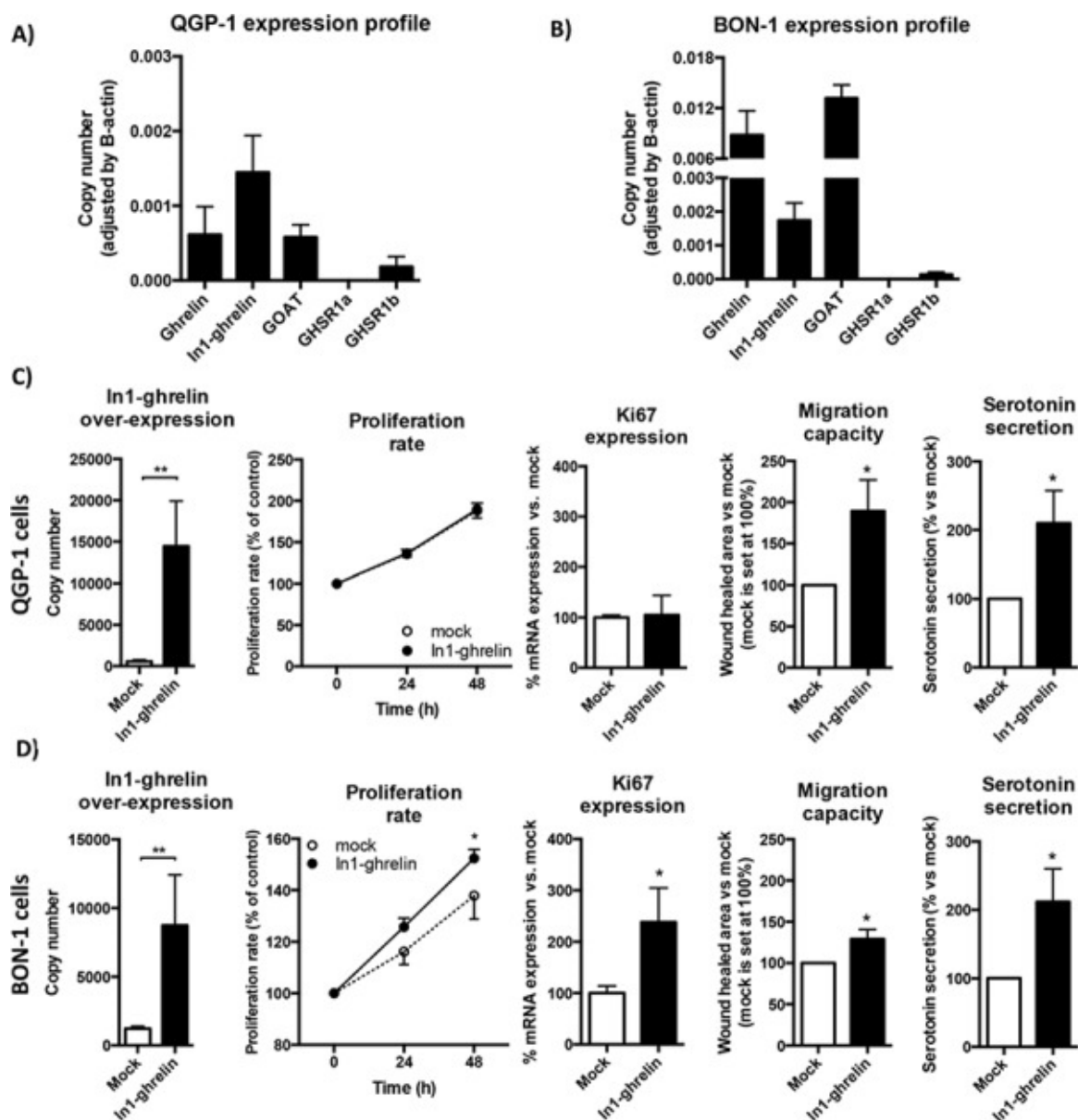


Figura 29. Efectos de la sobreexpresión de In1-ghrelina en líneas celulares derivadas de TNE.

(A) Niveles normalizados de los componentes del sistema de ghrelina (ghrelina, In1-ghrelina, GOAT, GHSR1a y GHSR1b) en líneas celulares QGP-1 y líneas celulares (B) BON-1. (C) Ensayos funcionales en las líneas celulares QGP-1 de In1-ghrelina y las líneas celulares (D) BON-1 comparadas con las células de control (condición *mock*). Orden del panel de izquierda a derecha: Sobreexpresión de In1-ghrelina; Tasa de proliferación; Expresión Ki67; Capacidad de migración y la secreción de serotonina. Los datos representan la media \pm SEM de $n = 3 - 6$ experimentos independientes. Los asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) indican valores que difieren significativamente de las células de control (condición *mock*).

También se investigó si la sobreexpresión In1-ghrelina era capaz de ejercer efectos apoptóticos midiendo los niveles de expresión de dos marcadores relacionados con la apoptosis, TP53 y Bcl2, en ambas líneas celulares. Los datos indicaron que la sobreexpresión de In1-ghrelina no alteró los niveles de expresión de estos dos marcadores de apoptosis en las líneas celulares de TNE (Figura 30), lo que sugiere que In1-ghrelina no está involucrada en el control de la expresión de estos marcadores relacionados con apoptosis.

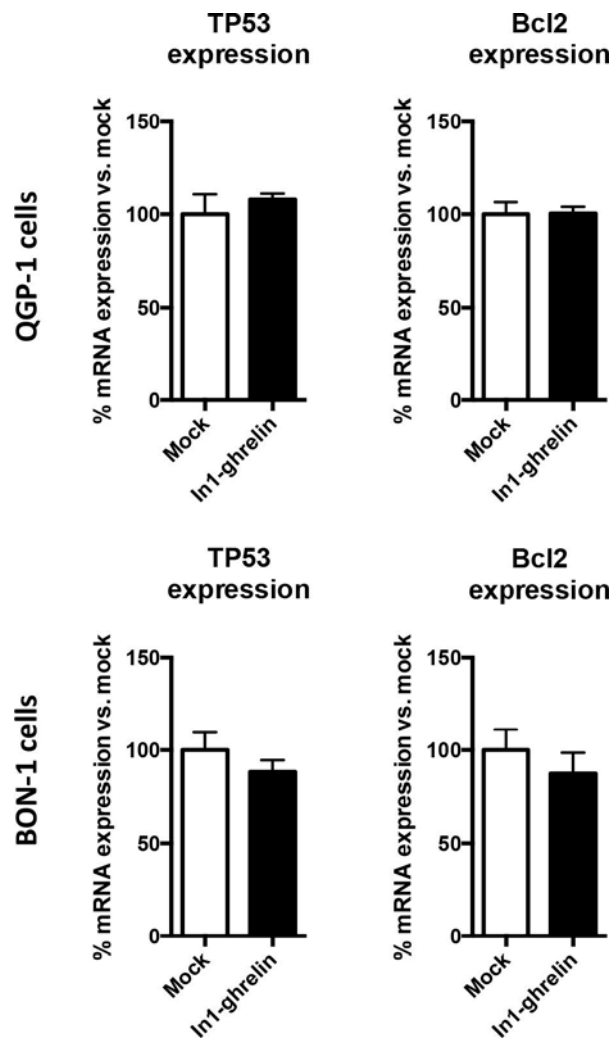


Figura 30. Expresión de los genes reguladores de la apoptosis en las líneas celulares de TNE. Los niveles de expresión de ARNm de dos genes reguladores principales de la apoptosis (TP53 y Bcl2) se determinaron mediante qPCR en líneas celulares QGP-1 transfectadas con In1-ghrelina y líneas celulares BON-1 y se compararon con células de control (condición *mock*). Los datos representan la media \pm EEM de $n = 3 - 6$ experimentos independientes.

DISCUSIÓN

1. Impacto pronóstico en la supervivencia global de las categorías G1/G2/G3 de la OMS 2010, enfermedad metastásica y edad en la Cohorte de Tumores Neuroendocrinos del Hospital Universitario de La Princesa (1995-2016)

Al inicio del trabajo de Tesis Doctoral se elaboró un registro de pacientes con TNE-GEP que habían sido atendidos en el Hospital Universitario de La Princesa durante los años 1995 a 2016. En estos pacientes se revisó el impacto en la supervivencia global de distintos factores clínico-patológicos haciendo énfasis en edad, sexo, síndrome hormonal asociado, estadio TNM, origen tumoral y grado tumoral (OMS 2010).

Este registro confirmó que los TNE son una familia de tumores heterogénea con una amplia gama de presentaciones clínicas. En la evolución de estos tumores intervienen múltiples factores y a diferencia de lo que se observa para otros tipos de cáncer, algunos de estos factores son más determinantes en la supervivencia de los pacientes que el propio estadio tumoral [2,3,14-18,114]. De hecho, la supervivencia global de nuestra serie fue favorable, con una tasa de supervivencia a los 5 años para toda la cohorte del 78%, pero con un pronóstico muy variable que oscilaba entre menos del 20 al 100% dependiendo del subgrupo, similar a lo ya publicado en series multicéntricas americanas y europeas en las que la supervivencia de estos pacientes puede variar entre menos del 30 al 100 % [2,20,115].

Tras una mediana de seguimiento de 14,4 años (rango: 0-19), en nuestra serie observamos que los pacientes menores de 30 años tenían una supervivencia a los 5 años de seguimiento del 100%, mientras que los de mayor edad de nuestra cohorte tenían una supervivencia notablemente inferior que los pacientes jóvenes (72% para mayores de 60 años). Los resultados son acordes con lo descrito hasta ahora en series multicéntricas en las que pacientes menores de 30 años presentan supervivencias a 5

años de 100% y pacientes mayores de 60 años presentan supervivencias en torno a 74-86% [2,20,114].

Con respecto al sexo, hubo una ligera preponderancia de los hombres en nuestra serie (frente a una leve preponderancia de las mujeres en otras series) [2,116], aunque la proporción sexo masculino/femenino fue cercana a 1. En la literatura, algunas series coinciden en relacionar el sexo femenino con la probabilidad de presentar una mayor supervivencia, independiente del estadio TNM [2,20]. En nuestra serie, aunque se evidenció una tendencia similar a la publicada, ésta no fue estadísticamente significativa.

De manera similar, la funcionalidad per se no fue un predictor significativo de supervivencia en esta cohorte. Algunos estudios han reportado que la funcionalidad del tumor puede tener influencia en la supervivencia de los pacientes, ya que el diagnóstico es más precoz por la presencia de síntomas relacionados con la hipersecreción hormonal, lo que mejora la supervivencia [117-123]. Es de prever que la tendencia a un diagnóstico más precoz de tumores no funcionantes, a medida que mejoran las técnicas de imagen y otras técnicas de diagnóstico, conduzca a atenuar esta diferencia entre la supervivencia de TNE funcionantes y no funcionantes. De acuerdo con este diagnóstico más precoz de TNE no funcionantes se ha observado en las últimas series un aumento constante en la incidencia de tumores no funcionantes, pero no de tumores funcionantes [124] y de hecho en nuestra cohorte existe un claro predominio de tumores no funcionantes (84%) lo que pudo tener una influencia en la supervivencia similar entre tumores funcionantes y no funcionantes dentro de nuestra serie.

Respecto al origen del tumor primario, el tracto gastrointestinal fue la localización más frecuente (57%), seguida del páncreas (37%) y de tumor primario desconocido (6%). Estos datos son similares a lo reportado en la literatura donde la prevalencia oscila entre 34% para tumores primarios pancreáticos y 47% para tumores primarios

intestinales a nivel nacional [20]. Asimismo, se observó una tendencia en los tumores primarios de origen intestinal a presentar una mayor supervivencia en comparación con los tumores pancreáticos y los de origen desconocido, de forma similar a lo reportado en bases de datos tumores multicéntricas [Registro SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) y GETNE (Grupo Español de Tumores Neuroendocrinos)] [2,20], donde los primarios de intestino grueso tenían un pronóstico benigno mientras que las peores cifras de supervivencia eran para los tumores primarios de origen pancreático y los de origen desconocido. La localización del tumor primario no fue un predictor significativo del pronóstico de los pacientes en nuestra cohorte en el análisis univariante o multivariante, probablemente porque al agrupar a todos los TNE gastrointestinales, incluyendo tumores de intestino delgado y grueso en un solo grupo, no se pudo evaluar el pronóstico de grupos aislados, como es el caso de los TNE de apéndice o recto, que tienen en general muy buen pronóstico.

Con respecto al análisis de los estadios TNM, cabe resaltar que una proporción significativa de pacientes (33%) en nuestro registro presentaba estadio IV al diagnóstico, muy superior a lo descrito en otras series (21% en la base de datos SEER) [2]. Dentro de las posibles explicaciones potenciales a esta mayor prevalencia estaría en primer lugar, que en nuestra serie había una menor proporción de pacientes con estadio no disponible en la historia clínica (20% en registro SEER frente a sólo el 2% en nuestra serie). Otra posible explicación podría ser un diagnóstico más tardío en nuestro medio por una menor disponibilidad de recursos de atención de la salud. Sin embargo, esta hipótesis no parece coherente con el hecho de que, a pesar de la detección de enfermedad en estadios más avanzados, la supervivencia global de nuestra cohorte fue superior a lo evidenciado en otras series [2]. En cuanto a la supervivencia en relación con el estadio TNM se observó heterogeneidad, especialmente en estadios intermedios (estadios II y III) como ha sido descrito previamente [3,20,115]. En el caso del estadio IV (presencia de enfermedad metastásica), el estadiaje si fue un marcador predictivo

independiente de enfermedad en nuestra cohorte. De hecho, en series previas se ha observado que estadios locales se relacionan con mejor supervivencia (superiores al 80%) en contraste con la enfermedad metastásica (supervivencias inferiores al 40%) [2,114].

Finalmente, hay que resaltar que el grado tumoral fue el factor que más influyó sobre la supervivencia, con tasas de supervivencia global a los 5 años para los tumores G1, G2 y G3 del 94%, 78% y 14%, respectivamente. En este sentido, cabe resaltar que la clasificación de la OMS de 2010 ha proporcionado una herramienta valiosa para estratificar el pronóstico de TNE basado en una medida objetiva, el índice de proliferación, que ha demostrado ser fácil de usar y reproducible [14-18]. Sin embargo, los TNE G1 tuvieron una supervivencia muy similar al subgrupo de TNE G2 y solamente el grado G3 tuvo un verdadero impacto en la supervivencia, lo cual hace pensar que la nueva clasificación de la OMS basada exclusivamente en el índice Ki-67 y el número de mitosis, ha anulado algunas características histológicas clásicas importantes que podrían ser de utilidad para una mejor clasificación. [24-26]. En este sentido sería interesante poder contar con nuevos marcadores moleculares que fueran capaces de mejorar la clasificación de estos tumores. Esta mejora en la clasificación tiene especial importancia porque el grado tumoral va a definir en muchos casos el tratamiento que va a recibir el paciente y el pronóstico.

En resumen, la supervivencia fue significativamente mayor en pacientes más jóvenes, con ausencia de enfermedad metastásica y con grado tumoral bajo. Con estos datos obtenidos se ha elaborado una tabla pronostica de riesgo de mortalidad que incluye tasa de proliferación (categorías G1/G2/G3 de la OMS 2010), presencia de enfermedad metastásica (estadio IV del TNM) y edad en la Cohorte de Tumores Neuroendocrinos del Hospital Universitario de La Princesa (1995-2016), que puede ser útil en un contexto clínico para planificar tratamientos en base al pronóstico del paciente.

2. Expresión de los sistemas reguladores SST/CORT en los TNE-GEP y su relación con marcadores angiogénicos como marcadores de malignidad

En esta Tesis Doctoral, se ha estudiado en un grupo de pacientes con TNE-GEP, el patrón de expresión de los receptores de somatostatina, en particular las variantes truncadas de sst5, así como su relación con marcadores clave del angiogénesis y su posible papel como marcadores predictivos de malignidad. Esta es la primera ocasión en que se analizan estos marcadores en una serie relativamente grande de muestras, especialmente cuando se considera la prevalencia limitada de este grupo heterogéneo de neoplasias.

En esta serie, se observó un patrón de expresión diferencial de receptores sst en muestras tumorales en comparación con sus correspondientes tejidos no tumorales adyacentes. Específicamente, sst1-3 estaban significativamente sobreexpresados en muestras tumorales en comparación con el tejido no tumoral adyacente. Estas observaciones confirman los informes previos y añaden más información sobre receptores somatostatina canónicos (sst1-5) [125-127], tema de especial interés teniendo en cuenta el hecho de que el tratamiento con ASS está prácticamente estandarizado en la práctica médica como primera línea de tratamiento después de la cirugía no curativa en TNE-GEP [110].

Un hallazgo relevante fue la identificación de la relación entre las variantes truncadas de sst5, sst5TMD4 y sst5TMD5, con características tumorales de malignidad. En primer lugar, encontramos una asociación entre la expresión de estos receptores truncados y el estadio de la enfermedad, siendo la expresión de sst5TMD4 mayor en los tumores de pacientes con TNE gastrointestinales con enfermedad residual, en comparación con aquellos sin enfermedad residual después de la cirugía. La

enfermedad residual incluye tanto tumores invasivos como diseminados, ya sea porque no fueron resecables por la cirugía o debido a recidiva tumoral después de una resección completa previa. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren un posible vínculo entre el receptor sst5TMD4 y una peor evolución clínica. En segundo lugar, los análisis apareados identificaron una expresión aumentada de sst5TMD4 en ganglios linfáticos metastáticos en comparación con sus correspondientes tumores primarios. Esto sugiere que los tumores primarios que expresan sst5TMD4 podrían tener mayor potencial para desarrollar metástasis ganglionares y/o progresión local. De hecho, los ensayos funcionales con células BON-1 transfectadas con sst5TMD4 evidenciaron una tasa de proliferación aumentada y una mayor expresión de Ki67. Curiosamente, aunque las células QGP-1 transfectadas con sst5TMD4 no imitaron estos resultados, esto podría relacionarse con una naturaleza diferente de ambas líneas celulares, con una mayor expresión de SST en las células QGP-1. Por otro lado, ambas líneas celulares de TNE transfectadas con sst5TMD4 mostraron mayor capacidad de migración, conservaron su capacidad para secretar serotonina y, de hecho, los niveles de serotonina aumentaron significativamente en ambos tipos celulares tras la transfección del receptor truncado.

En un estudio anterior, se ha demostrado que la transfección de sst5TMD4 en células MCF-7 (modelo para el cáncer de mama), aumento la expresión de Arp-2/3 (actina relacionadas con las proteínas) [90], un complejo que desempeña un papel importante en la regulación de filamentos de actina, y se asocia a una mayor capacidad de invasión las células cancerosas [128]. Además, en este mismo modelo, se encontró que las células con expresión endógena de sst5TMD4 mostraron niveles más altos de p-Akt y p-ERK1/2 (quinasas reguladas por señal extracelular), dos quinasas que activan las vías de transducción de señales implicadas en la proliferación, la migración y la transformación del fenotipo en las células cancerosas. Asimismo, se ha informado la sobreexpresión de sst5TMD4 en el cáncer de tiroides, tanto medular y no medular [91,129]. En este estudio, se evidenció que la presencia de sst5TMD4 en células

tiroideas confiere una mayor capacidad de crecimiento, modifica el fenotipo de la célula, disminuye los niveles de E-cadherina y β -catenina fosforilada, aumenta la vimentina, la β -catenina total y los niveles de glicógeno sintasa quinasa 3 beta fosforilados (GSK3B) y confiere mayor capacidad de invasión [129].

Hay otras vías moleculares complejas que han sido implicadas en la patogénesis de TNE-GEP. Por ejemplo, la desregulación de la ruta de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)-Akt-mTOR [130], o la señalización aberrante a través de receptores acoplados a proteína G como los receptores de SST, puede conducir a la modulación de varias enzimas clave, incluyendo PTPs (fosfotirosina fosfatasas) y MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógeno) [54,131,132]. En este complejo escenario molecular, parece biológicamente plausible que sst5TMD4 desempeñe un papel relevante en los TNE-GEP, ya que, a pesar de ser una variante truncada del receptor, puede influir e interferir con la regulación posterior de varias vías moleculares. Aunque más investigaciones sobre estas complejas relaciones moleculares serían necesarias para aclarar esta cuestión, el receptor sst5TMD4 podría estar asociado con una mayor progresión tumoral y un peor pronóstico en TNE-GEP.

Dada la naturaleza vascular de los TNE, que se ha demostrado en diferentes modelos experimentales [102,133], la angiogénesis podría desempeñar un papel relevante en la patogénesis y la progresión de TNE-GEP. En este sentido, se confirmó la presencia de marcadores angiogénicos clave, como es el caso de la Ang-1, Ang-2, Tie-2 y VEGF, en muestras tumorales de pacientes con TNE-GEP. Además, se observó una correlación positiva entre la expresión tumoral de estos marcadores de angiogénesis entre sí, así como una correlación negativa de estos marcadores con los subtipos sst3 y sst4. Curiosamente, la variante truncada sst5TMD4 se correlacionó positivamente con los cuatro marcadores angiogénicos. Los estudios inmunohistoquímicos e inmunofluorescencia confirmaron la co-expresión de marcadores angiogénicos y de sst5TMD4 en células tumorales positivas para CgA. Por

el contrario, el análisis inmunohistoquímico de tejido pancreático normal (sano) no evidenció una expresión detectable de sst5TMD4 en células de islotes positivas para CgA.

Estos resultados apoyan aún más la hipótesis de la interferencia potencial de estas variantes de receptores truncados en la vía de señalización clásica de los subtipos de receptores de sst canónicos [90], así como con las moléculas angiogénicas, como también sugieren estos datos. Además, existe evidencia que los ASS ejercen un efecto anti-angiogénico a través de su interacción con ssts, mediante la inhibición de la producción y la secreción de diversos factores angiogénicos [134,135]. En este contexto, los estudios anteriores han informado de que la señalización a través de sst3 disminuye la producción de VEGF [104], que la señalización de sst1 inhibe la proliferación endotelial, la migración y la neovascularización [108,136], y que sst1-3 inhibe la sintasa de óxido nítrico (NOS) [104,105]. Además, se ha demostrado que la expresión de sst2 tiene un papel antiangiogénico en modelos animales de hipoxia [137], lo que sugiere una interacción activa entre la red de señalización de somatostatina y angiogénesis. Además, la secreción de somatostatina se sabe que influye negativamente en la producción de VEGF [138], y los experimentos in vitro han demostrado que la administración de los ASS puede antagonizar el factor inducible por hipoxia 1a (HIF-1a) en las células de TNE [139]. En línea con estos estudios, los resultados de esta tesis apoyan la hipótesis de que sst5TMD4 podría desempeñar un papel importante en la compleja red molecular de la señalización de vascularización regulada por la SST. Específicamente, si tenemos en cuenta el hecho de que sst5TMD4 interactúa con sst2 [90,92], la subsiguiente disminución y/o la activación anormal de las vías de señalización de la transducción ligadas a sst2 podría conducir a un aumento de la vascularización, reduciendo el habitual efecto antiangiogénico de la SST.

Aunque reconocemos las limitaciones de este estudio con respecto al número de muestras evaluadas y su naturaleza observacional retrospectiva, cabe destacar el

hecho de que, a nuestro conocimiento, esta es una de las series TNE-GEP más grandes en las se ha realizado un análisis qPCR de los subtipos sst, incluyendo las variantes truncadas, y marcadores moleculares relacionados con la angiogénesis. Además, debemos tener en cuenta que, aunque el análisis del tejido no tumoral circundante, adyacente a cada tumor correspondiente no es el método ideal para la comparación con el tejido tumoral en el caso de los TNE, se utilizaron también para el estudio tejidos procedentes de controles sanos.

3. Expresión de los sistemas ghrelina en los TNE-GEP como marcadores de malignidad

Estudios anteriores sugieren que el sistema de ghrelina, que participa en varios tumores endocrinos [94,140,141], podría desempeñar también un papel relevante en la fisiopatología de los TNE. De hecho, algunos de sus componentes se han detectado previamente en los tejidos normales y tumorales del tracto gastrointestinal [94,142]. Específicamente, la ghrelina y el GHSR1a se expresan en tejidos gástricos [95,143-145], intestinales [143,146], pancreáticos [95,145] y/o pulmonares [147], aunque los niveles de expresión y el porcentaje de tumores que expresan ghrelina nativa o GHSR1a varían sustancialmente dependiendo del tejido analizado y del método de detección utilizado. Por otra parte, todavía no está claro si los perfiles de expresión de estos u otros componentes del sistema de ghrelina están alterados en TNE. De hecho, hasta donde sabemos, en esta Tesis Doctoral se presenta el primer análisis sistemático de la expresión de diferentes componentes del sistema de ghrelina en tejidos procedentes de TNE humanos y se analiza su relación con diversos parámetros clínicos de pacientes y su posible papel como marcadores predictivos de enfermedad.

Estos resultados revelan que el perfil de expresión del sistema de ghrelina se altera marcadamente en TNE en comparación con tejidos adyacentes no tumorales, y que esto depende del componente del sistema ghrelina examinado, y del lugar del tumor analizado (primario vs metástasis). Específicamente, la expresión de In1-ghrelina y de GHSR1a/1b, pero no de la ghrelina nativa, estaba incrementado en TNE primarios en comparación con los tejidos adyacentes no tumorales. Curiosamente al comparar tejido tumoral primario y metastásico, la expresión de In1-ghrelina y GHSR1a/1b fue superior en el tejido metastásico, y en el caso de GOAT, sólo se sobreexpresaba en los tejidos metastásicos. Además, los resultados muestran que la In1-ghrelina es la variante predominantemente expresada en los tejidos TNE, en términos de número de muestras de TNE y niveles de expresión (13 veces más alto que los niveles de la ghrelina nativa). Esta observación, se correlaciona favorablemente con otros trabajos previos que observaron que In1-ghrelina, pero no la ghrelina nativa, se sobreexpresaba en otros tumores endocrinos en comparación con los tejidos normales, incluyendo tumores de mama [77] e hipófisis [141]. Por lo tanto, parece razonable sugerir que la sobreexpresión de la variante In1-ghrelina podría ser un marcador celular/molecular común a diversos tumores endocrinos.

También se observó que una alta proporción de TNE expresan GOAT, una enzima que produce acilación de la ghrelina nativa, y presumiblemente también de la variante In1-ghrelina, siendo esta acilación un paso esencial para que la ghrelina nativa se pueda unir a GHSR1a para ejercer por lo tanto sus actividades neuroendocrinas [25,73,74]. La notable expresión de GOAT en los tejidos metastásicos de TNE en comparación con la de los tejidos de control adyacentes, está en consonancia con recientes hallazgos en los tejidos de cáncer de mama donde se evidenció sobreexpresión del ARNm de GOAT en comparación con los tejidos de control [77], así como datos de sobreexpresión en líneas celulares de cáncer de próstata cuando eran comparadas con líneas celulares derivadas de epitelio normal [148]. De hecho, los

niveles de expresión de GOAT se correlacionaron positivamente con In1-ghrelina, pero no con la expresión nativa de ghrelina, lo que sugiere que In1-ghrelina podría ser la principal variante funcionalmente vinculada a GOAT en estos TNE y reforzando la idea de que una acción autocrina/paracrina que implica estos dos componentes podría estar presente en TNE, especialmente en los tejidos metastásicos, donde ambos componentes estaban claramente elevados.

En cuanto a la expresión de los receptores, los análisis revelaron que los TNE no sólo expresaban GHSR1a, sino también la variante GHSR1b, lo cual está en línea con trabajos anteriores que demuestran que este último receptor está presente en los carcinoides intestinales [143] o TNE pancreáticos [145]. Además, este estudio es el primero en demostrar que los niveles de expresión de ambos receptores, GHSR1a y GHSR1b, estaban significativamente elevados en los tejidos de TNE en comparación con los tejidos adyacentes no tumorales. Específicamente, la variante de splicing GHSR1b era la isoforma dominante expresada en los tejidos TNE, ya que sus niveles eran marcadamente superiores (8 veces) que los de GHSR1a. Curiosamente, aunque los niveles de expresión de GHSR1b en los TNE fueron significativamente superiores a los de GHSR1a, ambos receptores se expresaron en un porcentaje similar de tejidos tumorales, donde sus niveles tendieron a correlacionarse ($p = 0,06$), lo que sugiere una posible asociación funcional entre ambos receptores en TNE-GEP. La expresión aumentada de GHSR1b se ha observado también en trabajos previos en la hiperplasia prostática [149], así como en los carcinomas de mama [77], donde su abundancia muestra una fuerte correlación con los niveles de expresión de In1-ghrelina. Aunque todavía se desconoce el papel (patofisiológico) real de GHSR1b, se ha informado que GHSR1b puede heterodimerizar con GHSR1a, promoviendo la translocación de los complejos receptores y actuando de este modo como un receptor dominante negativo para las funciones de señalización de GHSR1a [150,151]. En este escenario, es tentador especular que el sorprendente patrón de expresión de GHSR1a y GHSR1b

encontrado en los tejidos de TNE (es decir, un alto nivel de GHSR1b en relación con GHSR1a) pueda traducirse en un papel funcional relevante en esta patología (por ejemplo, interrumpiendo la señalización normal de ghrelina/GHSR1a). De hecho, mientras que los niveles de GHSR1a no se correlacionan con los de ghrelina nativa o In1-ghrelina en TNE, los niveles de expresión de GHSR1b sí que se correlacionaron con los de In1-ghrelina ($p = 0,002$), pero no los de ghrelina nativa. Estos datos sugieren que la In1-ghrelina podría ser una variante funcionalmente ligada a otros componentes del sistema de ghrelina (es decir, con GOAT y GHSR1b) en TNE, y que este aumento de variantes de splicing podría ser secundario a que la maquinaria celular responsable de los procesos de retención de intrones se altera [152].

Un mayor apoyo a que las variantes de splicing In1-ghrelina y GHSR1b pueden promover la patogénesis de los TNE se deriva de tres líneas de evidencia. En primer lugar, a partir de la observación de que no sólo hay un predominio cuantitativo de la expresión de estas variantes de splicing sobre sus respectivos homólogos canónicos en los tejidos TNE, sino también que las relaciones entre In1-ghrelina/ghrelina nativa y entre GHSR1b/GHSR1a están aumentadas en los tejidos procedentes de TNE comparado con tejidos controles (una ratio aproximada de 5 veces y 2 veces para In1-ghrelina/ghrelina nativa y GHSR1b/GHSR1a, respectivamente). La segunda línea de evidencia es la asociación directa de los niveles de expresión de In1-ghrelina, GHSR1b y GOAT, pero no de ghrelina nativa y GHSR1a con una peor evolución clínica, es decir, los tumores de pacientes con enfermedad progresiva tienen niveles más altos de estos componentes en comparación con pacientes con remisión completa del tumor. Estos resultados también son consistentes con publicaciones previas que muestran que la expresión de ghrelina nativa en los TNE pancreáticos no está clínicamente asociada con el tamaño del tumor, grado o estadio [151], y con estudios que muestran que las concentraciones plasmáticas de ghrelina nativa se encuentran dentro del rango normal en pacientes con TNE [6,111,112] (la elevación de la ghrelina nativa sólo se ha

informado en tres casos de ghrelinomas [90,91,112]). Además, se encontró que los niveles de expresión de In1-ghrelin y GHSR1b estuvieron significativamente más elevados en los tumores primarios de los pacientes que desarrollaron metástasis, en comparación con los que no lo hicieron. En tercer lugar, a favor de esta hipótesis está el análisis de la curva ROC que indicaba que sólo la expresión de In1-ghrelina y GHSR1b podría discriminar entre los diferentes grupos de diagnóstico según el resultado de seguimiento (remisión tumoral, enfermedad estable o enfermedad progresiva) y características malignas (expresión en tumores primarios de pacientes que desarrollaron metástasis en comparación con aquellos que no desarrollaron metástasis). Estos hallazgos sugieren una posible utilidad de estas variantes de splicing de ghrelina como herramientas para identificar biomarcadores novedosos para refinar el diagnóstico y predecir el pronóstico de TNE y para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas para el manejo de TNE.

Basado en resultados previos que muestran que la variante In1-ghrelina puede promover características de la agresividad en el cáncer de mama [73] y en las células de tumor hipofisario [93], así como en los resultados de este análisis, que demuestra que la expresión de la variante In1-ghrelin es un marcador valioso para clasificar a los pacientes de acuerdo al pronóstico, se decidió explorar el papel funcional de In1-ghrelina en dos modelos de células de TNE. Los datos in vitro revelaron que la sobreexpresión de In1-ghrelina aumentó las características de agresividad en células de TNE humanas (aumento de la tasa de proliferación y expresión del Ki67, así como capacidad de migración y secreción de serotonina) lo que demuestra que esta variante de splicing es funcionalmente activa en células TNE. Estos resultados respaldan y amplían los datos anteriores mostrando que In1-ghrelina influye en los procesos claves, clínicamente relevantes, como la proliferación o la secreción de hormonas en otras patologías endocrinas como el cáncer de mama [77] y los adenomas hipofisarios [141], sugiriendo que la sobreexpresión de In1-ghrelina podría ser un marcador celular/molecular común

DISCUSIÓN

a través de diferentes tumores endocrinos que se relaciona con las características de agresividad de estas patologías.

CONCLUSIONES

En relación a los datos contenidos en este trabajo de Tesis Doctoral se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. Tras una mediana de seguimiento de 14 años de la Cohorte de Tumores Neuroendocrinos del Hospital Universitario de La Princesa (1995-2016), la supervivencia global a los 5 años fue del 78%, con una variabilidad que osciló entre el 20 y el 100% dependiendo del subgrupo de pacientes estudiado.
2. La tasa de proliferación (categorías G1/G2/G3 de la clasificación de la OMS 2010), la presencia de enfermedad metastásica y la edad fueron factores pronósticos independientes de supervivencia. Estos resultados nos han permitido desarrollar un algoritmo pronóstico que puede ser utilizado en la decisión de tratamiento de pacientes con TNE-GEP.
3. En el estudio del sistema de la SST hemos observado una expresión aumentada de la variante truncada sst5TMD4 en tejidos tumorales comparados con tejido no tumoral, en metástasis de ganglios linfáticos respecto al tumor primario correspondiente y en pacientes con enfermedad residual respecto a pacientes sin enfermedad residual.
4. Líneas celulares de TNE transfectadas con el receptor sst5TMD4, presentaban un fenotipo más agresivo, en términos de mayor proliferación, migración y secreción hormonal.
5. Se encontró una relación entre la variante sst5TMD4 y los marcadores angiogénicos Ang1-2, Tie-2 y VEGF, lo cual apoyaría una relación fisiopatológica entre las variantes truncadas del sistema SST y la angiogénesis en estos tumores.
6. Diversos elementos del sistema ghrelina, incluidos la In1-ghrelina, sus receptores y la enzima modificadora GOAT se encontraron elevados en tejido tumoral de TNE en comparación con los tejidos normales adyacentes y en

CONCLUSIONES

pacientes con enfermedad progresiva comparados con pacientes con enfermedad estable o curada.

7. La adición de In1-ghrelina fue capaz de aumentar la agresividad en términos de proliferación y migración de líneas celulares de TNE transfectadas.
8. Los datos obtenidos sugieren una implicación de los sistemas de SST y ghrelina, especialmente de las variantes de splicing, en la patogénesis y/o en la evolución de los TNE-GEP, postulando un posible papel de estos sistemas como biomarcadores moleculares con valor diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rindi G, Villanacci V, Ubiali A. Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000;62 Suppl 1:19-26.
2. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One hundred years after "carcinoid": Epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the united states. *J Clin Oncol* 2008, Jun 20;26(18):3063-72.
3. Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, Svejda B, Kidd M, Modlin IM. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011, Mar;40(1):1-18, vii.
4. Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM. The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer* 2005, Dec 1;104(11):2292-309.
5. Scherübl H, Cadiot G, Jensen RT, Rösch T, Stölzel U, Klöppel G. Neuroendocrine tumors of the stomach (gastric carcinoids) are on the rise: Small tumors, small problems? *Endoscopy* 2010, Aug;42(8):664-71.
6. Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: A consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006, Oct;449(4):395-401.
7. Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, et al. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: A consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007, Oct;451(4):757-62.
8. Klöppel G, Couvelard A, Perren A, Komminoth P, McNicol AM, Nilsson O, et al. ENETS consensus guidelines for the standards of care in neuroendocrine tumors: Towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification. *Neuroendocrinology* 2009;90(2):162-6.

9. Klöppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: A statement. *Virchows Arch* 2010, Jun;456(6):595-7.
10. Rindi G, Arnold R, Bosman FT, Capella C, Klimstra DS, Klöppel G, et al. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System* 2010;4:13-4.
11. Williams ED, Sandler M. The classification of carcinoid tumours. *Lancet* 1963, Feb 2;1(7275):238-9.
12. Klöppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: The WHO classification. *Ann N Y Acad Sci* 2004, Apr;1014:13-27.
13. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17(6):1471-4.
14. Jernman J, Välimäki MJ, Louhimo J, Haglund C, Arola J. The novel WHO 2010 classification for gastrointestinal neuroendocrine tumours correlates well with the metastatic potential of rectal neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology* 2012;95(4):317-24.
15. Yamaguchi T, Fujimori T, Tomita S, Ichikawa K, Mitomi H, Ohno K, et al. Clinical validation of the gastrointestinal NET grading system: Ki67 index criteria of the WHO 2010 classification is appropriate to predict metastasis or recurrence. *Diagn Pathol* 2013, Apr 22;8:65.
16. Wang L, Yang M, Zhang Y, Xu S, Tian BL. Prognostic validation of the WHO 2010 grading system in pancreatic insulinoma patients. *Neoplasma* 2015;62(3):484-90.

17. Ricci C, Casadei R, Taffurelli G, Campana D, Ambrosini V, Pagano N, et al. Validation of the 2010 WHO classification and a new prognostic proposal: A single centre retrospective study of well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumours. *Pancreatology* 2016;16(3):403-10.
18. Shen C, Yin Y, Chen H, Tang S, Yin X, Zhou Z, et al. Neuroendocrine tumors of colon and rectum: Validation of clinical and prognostic values of the world health organization 2010 grading classifications and european neuroendocrine tumor society staging systems. *Oncotarget* 2017, Mar 28;8(13):22123-34.
19. Panzuto F, Boninsegna L, Fazio N, Campana D, Pia Brizzi M, Capurso G, et al. Metastatic and locally advanced pancreatic endocrine carcinomas: Analysis of factors associated with disease progression. *J Clin Oncol* 2011, Jun 10;29(17):2372-7.
20. Garcia-Carbonero R, Capdevila J, Crespo-Herrero G, Díaz-Pérez JA, Martínez Del Prado MP, Alonso Orduña V, et al. Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (gep-nets): Results from the national cancer registry of spain (RGETNE). *Ann Oncol* 2010, Sep;21(9):1794-803.
21. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermarck LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): The NORDIC NEC study. *Ann Oncol* 2013, Jan;24(1):152-60.
22. Coriat R, Walter T, Terris B, Couvelard A, Ruszniewski P. Gastroenteropancreatic well-differentiated grade 3 neuroendocrine tumors: Review and position statement. *Oncologist* 2016, Oct;21(10):1191-9.
23. Heetfeld M, Chougnet CN, Olsen IH, Rinke A, Borbath I, Crespo G, et al. Characteristics and treatment of patients with G3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 2015, Aug;22(4):657-64.

24. Basturk O, Yang Z, Tang LH, Hruban RH, Adsay V, McCall CM, et al. The high-grade (WHO G3) pancreatic neuroendocrine tumor category is morphologically and biologically heterogeneous and includes both well differentiated and poorly differentiated neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2015, May;39(5):683-90.
25. Vélayoudom-Céphise FL, Duvillard P, Foucan L, Hadoux J, Chougnet CN, Leboulleux S, et al. Are G3 ENETS neuroendocrine neoplasms heterogeneous? *Endocr Relat Cancer* 2013, Oct;20(5):649-57.
26. Milione M, Maisonneuve P, Spada F, Pellegrinelli A, Spaggiari P, Albarello L, et al. The clinicopathologic heterogeneity of grade 3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: Morphological differentiation and proliferation identify different prognostic categories. *Neuroendocrinology* 2017;104(1):85-93.
27. Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2011, Oct;18 Suppl 1:S17-25.
28. Schally AV. Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res* 1988, Dec 15;48(24 Pt 1):6977-85.
29. Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996, Jan 25;334(4):246-54.
30. Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: A report from the PROMID study group. *J Clin Oncol* 2009, Oct 1;27(28):4656-63.
31. Caplin ME, Pavel M, Ćwikła JB, Phan AT, Raderer M, Sedláčková E, et al. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2014, Jul 17;371(3):224-33.

32. Sun W, Lipsitz S, Catalano P, Mailliard JA, Haller DG, Eastern Cooperative Oncology Group. Phase II/III study of doxorubicin with fluorouracil compared with streptozocin with fluorouracil or dacarbazine in the treatment of advanced carcinoid tumors: Eastern cooperative oncology group study E1281. *J Clin Oncol* 2005, Aug 1;23(22):4897-904.
33. Moertel CG, Lefkopoulo M, Lipsitz S, Hahn RG, Klaassen D. Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1992, Feb 20;326(8):519-23.
34. Vilar E, Salazar R, Pérez-García J, Cortes J, Oberg K, Tabernero J. Chemotherapy and role of the proliferation marker ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2007, Jun;14(2):221-32.
35. O'Toole D, Couvelard A, Rebours V, Zappa M, Hentic O, Hammel P, et al. Molecular markers associated with response to chemotherapy in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2010, Dec;17(4):847-56.
36. Zhang J, Jia Z, Li Q, Wang L, Rashid A, Zhu Z, et al. Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer* 2007, Apr 15;109(8):1478-86.
37. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009, Mar 3;15(3):220-31.
38. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, et al. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2006, Jan 1;24(1):25-35.

39. Kulke MH, Lenz HJ, Meropol NJ, Posey J, Ryan DP, Picus J, et al. Activity of sunitinib in patients with advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol* 2008, Jul 10;26(20):3403-10.
40. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, et al. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011, Feb 10;364(6):501-13.
41. Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mtor in cellular transformation induced by the oncoproteins p3k and akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, Jan 2;98(1):136-41.
42. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, Jul;2(7):489-501.
43. Yao JC, Phan AT, Chang DZ, Wolff RA, Hess K, Gupta S, et al. Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: Results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2008, Sep 10;26(26):4311-8.
44. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: A phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008, Apr 1;26(10):1603-10.
45. Yao JC, Lombard-Bohas C, Baudin E, Kvols LK, Rougier P, Ruzniewski P, et al. Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: A phase II trial. *J Clin Oncol* 2010, Jan 1;28(1):69-76.
46. Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Hörsch D, Winkler RE, et al. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): A

randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2011, Dec 10;378(9808):2005-12.

47. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011, Feb 10;364(6):514-23.

48. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, et al. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): A randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2016, Mar 5;387(10022):968-77.

49. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973, Jan 5;179(4068):77-9.

50. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999, Dec 9;402(6762):656-60.

51. Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tscho P M. Minireview: Ghrelin and the regulation of energy balance-a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 2001, Oct 1;142(10):4163-9.

52. de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, et al. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 1996, May 16;381(6579):242-5.

53. Tostivint H, Joly L, Lihmann I, Parmentier C, Lebon A, Morisson M, et al. Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, Feb 14;103(7):2237-42.

54. Møller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003, Sep 22;1616(1):1-84.
55. Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Martínez-Fuentes AJ, Quintero A, Gutiérrez-Pascual E, et al. Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: Lessons from comparative endocrinology. *Ann N Y Acad Sci* 2009, Apr;1163:137-53.
56. Spier AD, de Lecea L. Cortistatin: A member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, Sep;33(2-3):228-41.
57. de Lecea L, Castaño JP. Cortistatin: Not just another somatostatin analog. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006, Jul;2(7):356-7.
58. Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Höllt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett* 1992, Oct 26;311(3):290-4.
59. Durán-Prado M, Gahete MD, Martínez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, et al. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, Jul;94(7):2634-43.
60. Reubi JC, Kvols L, Krenning E, Lamberts SW. Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue. *Metabolism* 1990, Sep;39(9 Suppl 2):78-81.
61. Jonas S, John M, Boese-Landgraf J, Häring R, Prevost G, Thomas F, et al. Somatostatin receptor subtypes in neuroendocrine tumor cell lines and tumor tissues. *Langenbecks Arch Chir* 1995;380(2):90-5.
62. Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Castaño JP. Truncated somatostatin receptors as new players in somatostatin-cortistatin pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 2011, Mar;1220:6-15.

63. Broglio F, Grottoli S, Arvat E, Ghigo E. Endocrine actions of cortistatin: In vivo studies. *Mol Cell Endocrinol* 2008, May 14;286(1-2):123-7.
64. Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Pozo-Salas AI, Martínez-Fuentes AJ, de Lecea L, Gracia-Navarro F, et al. Cortistatin is not a somatostatin analogue but stimulates prolactin release and inhibits GH and ACTH in a gender-dependent fashion: Potential role of ghrelin. *Endocrinology* 2011, Dec;152(12):4800-12.
65. Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Duran-Prado M, Pozo-Salas AI, Malagón MM, Gracia-Navarro F, et al. Identification and characterization of new functional truncated variants of somatostatin receptor subtype 5 in rodents. *Cell Mol Life Sci* 2010, Apr;67(7):1147-63.
66. Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J Endocrinol Invest* 2001, Jan;24(1):RC1-3.
67. Jiang H, Smith RG. Modification of ghrelin and somatostatin signaling by formation of ghs-r1a/SSTR5 heterodimers. The Endocrine Society's 89th Annual Meeting. Toronto, ON 2007;P9:299.
68. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999, Jul;20(3):157-98.
69. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Robledo G, Delgado M. Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J Exp Med* 2006, Mar 20;203(3):563-71.
70. Gonzalez-Rey E, Delgado M. Emergence of cortistatin as a new immunomodulatory factor with therapeutic potential in immune disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2008, May 14;286(1-2):135-40.

71. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Del Moral RG, Varela N, Delgado M. Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and th1 responses. *Ann Rheum Dis* 2007, May;66(5):582-8.
72. Pong SS, Chaung LY, Dean DC, Nargund RP, Patchett AA, Smith RG. Identification of a new g-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol Endocrinol* 1996, Jan;10(1):57-61.
73. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008, Feb 8;132(3):387-96.
74. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, Apr 29;105(17):6320-5.
75. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005, Nov 11;310(5750):996-9.
76. Kineman RD, Gahete MD, Luque RM. Identification of a mouse ghrelin gene transcript that contains intron 2 and is regulated in the pituitary and hypothalamus in response to metabolic stress. *J Mol Endocrinol* 2007, May;38(5):511-21.
77. Gahete MD, Córdoba-Chacón J, Hergueta-Redondo M, Martínez-Fuentes AJ, Kineman RD, Moreno-Bueno G, et al. A novel human ghrelin variant (in1-ghrelin) and ghrelin-o-acyltransferase are overexpressed in breast cancer: Potential pathophysiological relevance. *PLoS One* 2011;6(8):e23302.
78. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996, Aug 16;273(5277):974-7.

79. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, Fujimiya M. Ghrelin, appetite, and gastric motility: The emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J* 2004, Mar;18(3):439-56.
80. Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res* 2009, Nov;41(11):814-21.
81. Luque RM, Park S, Kineman RD. Role of endogenous somatostatin in regulating GH output under basal conditions and in response to metabolic extremes. *Mol Cell Endocrinol* 2008, May 14;286(1-2):155-68.
82. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mrna levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001, Nov;50(11):2438-43.
83. Jeffery PL, Murray RE, Yeh AH, McNamara JF, Duncan RP, Francis GD, et al. Expression and function of the ghrelin axis, including a novel preproghrelin isoform, in human breast cancer tissues and cell lines. *Endocr Relat Cancer* 2005, Dec;12(4):839-50.
84. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002, Jan;51(1):124-9.
85. van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 2004, Jun;25(3):426-57.
86. Bousquet C, Lasfargues C, Chalabi M, Billah SM, Susini C, Vezzosi D, et al. Clinical review: Current scientific rationale for the use of somatostatin analogs and mtor inhibitors in neuroendocrine tumor therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2012, Mar;97(3):727-37.

87. Theodoropoulou M, Stalla GK. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol* 2013, Aug;34(3):228-52.
88. Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2002, Dec;13(10):451-7.
89. Butturini G, Bettini R, Missiaglia E, Mantovani W, Dalai I, Capelli P, et al. Predictive factors of efficacy of the somatostatin analogue octreotide as first line therapy for advanced pancreatic endocrine carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2006, Dec;13(4):1213-21.
90. Durán-Prado M, Gahete MD, Hergueta-Redondo M, Martínez-Fuentes AJ, Córdoba-Chacón J, Palacios J, et al. The new truncated somatostatin receptor variant sst5tmd4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells. *Oncogene* 2012, Apr 19;31(16):2049-61.
91. Puig-Domingo M, Luque RM, Reverter JL, López-Sánchez LM, Gahete MD, Culler MD, et al. The truncated isoform of somatostatin receptor5 (sst5tmd4) is associated with poorly differentiated thyroid cancer. *PLoS One* 2014;9(1):e85527.
92. Durán-Prado M, Saveanu A, Luque RM, Gahete MD, Gracia-Navarro F, Jaquet P, et al. A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5tmd4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, May;95(5):2497-502.
93. Chancón B, Luque RM, Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Pozo-Salas AI, Castaño JP, et al. Role of endogenous cortistatin in the regulation of ghrelin system expression at pancreatic level under normal and obese conditions. *PLoS One* 2013;8(2):e57834.
94. Gahete MD, Rincón-Fernández D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibáñez-Costa A, Martínez-Fuentes AJ, et al. Ghrelin gene products, receptors, and GOAT

enzyme: Biological and pathophysiological insight. *J Endocrinol* 2014, Jan;220(1):R1-24.

95. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, Feb;86(2):881-7.

96. Papotti M, Duregon E, Volante M. Ghrelin and tumors. *Endocr Dev* 2013;25:122-34.

97. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997, Feb;18(1):4-25.

98. Jones PF. Not just angiogenesis--wider roles for the angiopoietins. *J Pathol* 2003, Dec;201(4):515-27.

99. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006, Mar 10;312(5):630-41.

100. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: A link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006, Dec;27(12):552-8.

101. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays vegf-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, Aug 20;99(17):11205-10.

102. Figueroa-Vega N, Díaz A, Adrados M, Alvarez-Escolá C, Paniagua A, Aragonés J, et al. The association of the angiopoietin/tie-2 system with the development of metastasis and leukocyte migration in neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2010, Dec;17(4):897-908.

103. Albin A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, et al. Somatostatin controls kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB J* 1999, Apr;13(6):647-55.
104. Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, et al. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology* 2003, Apr;144(4):1574-84.
105. Arena S, Pattarozzi A, Corsaro A, Schettini G, Florio T. Somatostatin receptor subtype-dependent regulation of nitric oxide release: Involvement of different intracellular pathways. *Mol Endocrinol* 2005, Jan;19(1):255-67.
106. Lopez F, Ferjoux G, Cordelier P, Saint-Laurent N, Estève JP, Vaysse N, et al. Neuronal nitric oxide synthase: A substrate for SHP-1 involved in sst2 somatostatin receptor growth inhibitory signaling. *FASEB J* 2001, Oct;15(12):2300-2.
107. Danesi R, Agen C, Benelli U, Paolo AD, Nardini D, Bocci G, et al. Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201-995). *Clin Cancer Res* 1997, Feb;3(2):265-72.
108. Curtis SB, Hewitt J, Yakubovitz S, Anzarut A, Hsiang YN, Buchan AM. Somatostatin receptor subtype expression and function in human vascular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, Jun;278(6):H1815-22.
109. Prokosch V, Fink J, Heiduschka P, Melkonyan H, Thanos S. VEGF, ang-2 and SRIF associated abnormal postnatal development of the retinal capillary network in the royal college of surgeons rat. *Exp Eye Res* 2011, Feb;92(2):128-37.
110. Garcia-Carbonero R, Jimenez-Fonseca P, Teulé A, Barriuso J, Sevilla I. SEOM clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastroenteropancreatic

neuroendocrine neoplasms (gep-nens) 2014. Clin Transl Oncol 2014, Dec;16(12):1025-34.

111. Evers BM, Townsend CM, Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, et al. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. Gastroenterology 1991, Aug;101(2):303-11.

112. Iguchi H, Hayashi I, Kono A. A somatostatin-secreting cell line established from a human pancreatic islet cell carcinoma (somatostatinoma): Release experiment and immunohistochemical study. Cancer Res 1990, Jun 15;50(12):3691-3.

113. Pinato DJ, Ramachandran R, Toussi ST, Vergine M, Ngo N, Sharma R, et al. Immunohistochemical markers of the hypoxic response can identify malignancy in pheochromocytomas and paragangliomas and optimize the detection of tumours with VHL germline mutations. Br J Cancer 2013, Feb 5;108(2):429-37.

114. Dasari A, Shen Ch, Halperin D, et al. Survival Trends of Neuroendocrine Tumors and Associated Prognostic Factors. Poster presentation presented at: North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS) Annual Symposium; 2016 Oct 30; Jackson Hole, Wyoming.

115. Martin-Perez E, Capdevila J, Castellano D, Jimenez-Fonseca P, Salazar R, Beguiristain-Gomez A, et al. Prognostic factors and long-term outcome of pancreatic neuroendocrine neoplasms: Ki-67 index shows a greater impact on survival than disease stage. The large experience of the spanish national tumor registry (RGETNE). Neuroendocrinology 2013;98(2):156-68.

116. Hauso O, Gustafsson BI, Kidd M, Waldum HL, Drozdov I, Chan AK, Modlin IM. Neuroendocrine tumor epidemiology: Contrasting norway and north america. Cancer 2008, Nov 15;113(10):2655-64.

117. Hochwald SN, Zee S, Conlon KC, Colleoni R, Louie O, Brennan MF, Klimstra DS. Prognostic factors in pancreatic endocrine neoplasms: An analysis of 136 cases with a proposal for low-grade and intermediate-grade groups. *J Clin Oncol* 2002, Jun 1;20(11):2633-42.
118. La Rosa S, Sessa F, Capella C, Riva C, Leone BE, Klersy C, et al. Prognostic criteria in nonfunctioning pancreatic endocrine tumours. *Virchows Arch* 1996, Dec;429(6):323-33.
119. Panzuto F, Nasoni S, Falconi M, Corleto VD, Capurso G, Cassetta S, et al. Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: Comparison between gastrointestinal and pancreatic localization. *Endocr Relat Cancer* 2005, Dec;12(4):1083-92.
120. Gullo L, Migliori M, Falconi M, Pederzoli P, Bettini R, Casadei R, et al. Nonfunctioning pancreatic endocrine tumors: A multicenter clinical study. *Am J Gastroenterol* 2003, Nov;98(11):2435-9.
121. Wang SE, Su CH, Kuo YJ, Shyr YM, Li AF, Chen TH, et al. Comparison of functional and nonfunctional neuroendocrine tumors in the pancreas and peripancreatic region. *Pancreas* 2011, Mar;40(2):253-9.
122. Bilimoria KY, Tomlinson JS, Merkow RP, Stewart AK, Ko CY, Talamonti MS, Bentrem DJ. Clinicopathologic features and treatment trends of pancreatic neuroendocrine tumors: Analysis of 9,821 patients. *J Gastrointest Surg* 2007, Nov;11(11):1460-7; discussion 1467-9.
123. Chu QD, Hill HC, Douglass HO, Driscoll D, Smith JL, Nava HR, Gibbs JF. Predictive factors associated with long-term survival in patients with neuroendocrine tumors of the pancreas. *Ann Surg Oncol* 2002, Nov;9(9):855-62.

124. Kuiper P, Verspaget HW, van Slooten HJ, Overbeek L, Biemond I, Lamers CB. Pathological incidence of duodenopancreatic neuroendocrine tumors in the netherlands: A pathologisch anatomisch landelijk geautomatiseerd archief study. *Pancreas* 2010, Nov;39(8):1134-9.
125. Sidéris L, Dubé P, Rinke A. Antitumor effects of somatostatin analogs in neuroendocrine tumors. *Oncologist* 2012;17(6):747-55.
126. Aparicio T, Ducreux M, Baudin E, Sabourin JC, De Baere T, Mitry E, et al. Antitumour activity of somatostatin analogues in progressive metastatic neuroendocrine tumours. *Eur J Cancer* 2001, May;37(8):1014-9.
127. Kaemmerer D, Träger T, Hoffmeister M, Sipos B, Hommann M, Sängler J, et al. Inverse expression of somatostatin and CXCR4 chemokine receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms of different malignancy. *Oncotarget* 2015, Sep 29;6(29):27566-79.
128. Wang W, Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Segall JE, Condeelis JS. Tumor cells caught in the act of invading: Their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* 2005, Mar;15(3):138-45.
129. Molè D, Gentilin E, Ibañez-Costa A, Gagliano T, Gahete MD, Tagliati F, et al. The expression of the truncated isoform of somatostatin receptor subtype 5 associates with aggressiveness in medullary thyroid carcinoma cells. *Endocrine* 2015, Apr 9;50(2):442-50.
130. Briest F, Grabowski P. PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: The complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Theranostics* 2014;4(4):336-65.

131. Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C. Opportunities in somatostatin research: Biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2003, Dec;2(12):999-1017.
132. Florio T. Somatostatin/somatostatin receptor signalling: Phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol* 2008, May 14;286(1-2):40-8.
133. Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N. Role of bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, Feb 19;105(7):2640-5.
134. Toumpanakis C, Caplin ME. Update on the role of somatostatin analogs for the treatment of patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Semin Oncol* 2013, Feb;40(1):56-68.
135. Keskin O, Yalcin S. A review of the use of somatostatin analogs in oncology. *Onco Targets Ther* 2013;6:471-83.
136. Bocci G, Culler MD, Fioravanti A, Orlandi P, Fasciani A, Colucci R, et al. In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. *Eur J Clin Invest* 2007, Sep;37(9):700-8.
137. Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: Results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, Aug;48(8):3480-9.
138. Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, Held-Feindt J. Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int J Cancer* 2001, May 15;92(4):545-50.
139. Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejari M, et al. VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mtor pathway. *Neuroendocrinology* 2010;91(3):268-78.

140. Chopin LK, Seim I, Walpole CM, Herington AC. The ghrelin axis--does it have an appetite for cancer progression? *Endocr Rev* 2012, Dec;33(6):849-91.
141. Ibáñez-Costa A, Gahete MD, Rivero-Cortés E, Rincón-Fernández D, Nelson R, Beltrán M, et al. In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features. *Sci Rep* 2015, Mar 4;5:8714.
142. Vu JP, Wang HS, Germano PM, Pisegna JR. Ghrelin in neuroendocrine tumors. *Peptides* 2011, Nov;32(11):2340-7.
143. Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, Oct;86(10):5052-9.
144. Rindi G, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, Cocchi D, et al. Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol* 2002, Jun;117(6):521-5.
145. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, et al. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, Mar;87(3):1300-8.
146. Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, et al. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 2008, Dec;29(12):2159-68.
147. Cassoni P, Allia E, Marrocco T, Ghè C, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. Ghrelin and cortistatin in lung cancer: Expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line. *J Endocrinol Invest* 2006, Oct;29(9):781-90.
148. Seim I, Jeffery PL, de Amorim L, Walpole CM, Fung J, Whiteside EJ, et al. Ghrelin o-acyltransferase (GOAT) is expressed in prostate cancer tissues and cell lines and

expression is differentially regulated in vitro by ghrelin. *Reprod Biol Endocrinol* 2013, Jul 23;11:70.

149. Cassoni P, Ghé C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, et al. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 2004, Feb;150(2):173-84.

150. Chow KB, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CH, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (ghs-r1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (ghs-r1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol* 2012, Jan 2;348(1):247-54.

151. Leung PK, Chow KB, Lau PN, Chu KM, Chan CB, Cheng CH, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (ghs-r1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell Signal* 2007, May;19(5):1011-22.

152. Kim E, Goren A, Ast G. Insights into the connection between cancer and alternative splicing. *Trends Genet* 2008, Jan;24(1):7-10.

ANEXO

Presence of sst5TMD4, a truncated splice variant of the somatostatin receptor subtype 5, is associated to features of increased aggressiveness in pancreatic neuroendocrine tumors

Miguel Sampedro-Núñez^{1,*}, Raúl M. Luque^{2,*}, Ana M. Ramos-Leví^{1,*}, Manuel D. Gahete², Ana Serrano-Somavilla¹, Alicia Villa-Osaba², Magdalena Adrados¹, Alejandro Ibáñez-Costa², Elena Martín-Pérez¹, Michael D. Culler³, Mónica Marazuela^{1,*}, Justo P. Castaño^{2,*}

¹Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28006, Spain

²Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Córdoba 14014, Spain

³IPSEN Bioscience, Cambridge, Massachusetts 02142, USA

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Justo P. Castaño, **e-mail:** justo@uco.es
Raúl M. Luque, **e-mail:** raul.luque@uco.es
Monica Marazuela, **e-mail:** monica.marazuela@salud.madrid.org

Keywords: neuroendocrine tumors, sst5TMD4, sst5TMD5, angiogenesis, gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors

Received: July 31, 2015

Accepted: November 21, 2015

Published: December 11, 2015

ABSTRACT

Purpose: Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are rare and heterogeneous tumors, and their biological behavior is not well known. We studied the presence and potential functional roles of somatostatin receptors (sst1-5), focusing particularly on the truncated variants (sst5TMD4, sst5TMD5) and on their relationships with the angiogenic system (Ang/Tie-2 and VEGF) in human GEP-NETs.

Experimental Design: We evaluated 42 tumor tissue samples (26 primary/16 metastatic) from 26 patients with GEP-NETs, and 30 non-tumoral tissues (26 from adjacent non-tumor regions and 4 from normal controls) from a single center. Expression of sst1-5, sst5TMD4, sst5TMD5, Ang1-2, Tie-2 and VEGF was analyzed using real-time qPCR, immunofluorescence and immunohistochemistry. Expression levels were associated with tumor characteristics and clinical outcomes. Functional role of sst5TMD4 was analyzed in GEP-NET cell lines.

Results: sst1 exhibited the highest expression in GEP-NET, whilst sst2 was the most frequently observed sst-subtype (90.2%). Expression levels of sst1, sst2, sst3, sst5TMD4, and sst5TMD5 were significantly higher in tumor tissues compared to their adjacent non-tumoral tissue. Lymph-node metastases expressed higher levels of sst5TMD4 than in its corresponding primary tumor tissue. sst5TMD4 was also significantly higher in intestinal tumor tissues from patients with residual disease of intestinal origin compared to those with non-residual disease. Functional assays demonstrated that the presence of sst5TMD4 was associated to enhanced malignant features in GEP-NET cells. Angiogenic markers correlated positively with sst5TMD4, which was confirmed by immunohistochemical/fluorescence studies.

Conclusions: sst5TMD4 is overexpressed in GEP-NETs and is associated to enhanced aggressiveness, suggesting its potential value as biomarker and target in GEP-NETs.

INTRODUCTION

Neuroendocrine tumors (NETs) comprise a heterogeneous group of neoplasms derived from enterochromaffin epithelial cells, which retain many structural and functional features of normal endocrine cells, including production of chromogranin A (CgA), synaptophysin, and other peptides [1]. The majority of these tumors are of gastro-entero-pancreatic origin (GEP-NET) and, although they were initially believed to be uncommon neoplasms, their incidence and prevalence is increasing, and not only because of improved imaging techniques [2].

Unlike other malignancies, the natural history of NETs is significantly variable and difficult to predict. Most patients with well-differentiated GEP-NETs, even if metastatic disease is present at diagnosis, may present with a relatively indolent course, whilst others may progress rapidly, with median survival duration ranging from 5 to 56 months in advanced stage disease [2]. To date, there are very few biomarkers of prognosis, which could be useful to assess prognosis and select patients whose disease may progress rapidly or who may benefit from early initiation of therapy [3].

Although the first therapeutic option for GEP-NETs is the surgical approach, complete cure is not possible in many cases, and development of systemic medical treatments has gained scientific and clinical interest over the past recent years. In this setting, synthetic somatostatin analogues (SSAs) have emerged as a successful tool for the management of neuroendocrine diseases [4, 5]. SSAs inhibit hormonal secretion by binding to ssts, and thus provide relief of symptoms in patients with functional NETs. Additionally, they exert antitumor effects; this was confirmed by the results of the PROMID study [6], which reported a significant increase in time to tumor progression in functionally active and inactive tumors; and in a more evident way, in the recent CLARINET study, which further reported an increase in median progression-free survival in SSA-treated patients [7].

SSAs exert their biological actions by binding to a family of G protein-coupled, seven transmembrane-spanning somatostatin receptors (sst1-sst5) in neuroendocrine cells, which, depending on the tumor type and the specific set of receptors involved, lead to decreased hormonal secretion, decreased growth and mitotic rates, increased apoptosis, and/or inhibition of cell signaling and protein synthesis, including inhibition of production and secretion of various angiogenic factors [8–11]. In mammals, ssts are encoded by five separate intronless genes (SSTR1-SSTR5), which have been classically considered to give rise to five different somatostatin receptors, named sst1 through sst5, plus, in mouse, a carboxyterminal spliced

variant of sst2, named sst2B. However, recent studies from our group have unveiled the existence of new truncated, albeit functional sst5 variants, generated by non-canonical splicing, which in humans bear 5 and 4 transmembrane domains (instead of the usual 7), and are therefore referred to as sst5TMD4 and sst5TMD5 [12, 13].

As sst subtypes represent obligatory mediators of SSA actions, variability in the sst1-5 expression profile in NET cells has been reasonably suggested as a potential predictive factor for SSA response. In fact, antiproliferative effects of SSAs have been associated to their affinity for sst2 [14, 15]; and conversely, the tachyphylaxis that eventually develops in some cases during long-term management of NETs has been attributed to a possible loss of sst2 availability following receptor internalization and degradation [16]. Moreover, since antisecretory and antiproliferative effects occur at different time-windows, involvement of different receptors and/or molecular mechanisms has been also proposed [17]. For instance, the presence of the truncated variant sst5TMD4, which interacts with sst2 and disrupts its signaling [18], may influence spontaneous or SSA-inhibited hormone secretion [19], as well as aberrant cell proliferation [18, 20], and has been proposed as a biomarker for increased risk of malignant behavior in certain tumors [18, 20, 21].

Another issue deserving further investigation in GEP-NETs concerns angiogenesis, since formation of new vessels from pre-existing vasculature is crucial for local invasion and metastatic spread of tumors. Molecules that exert important regulatory roles in angiogenesis in NETs include the vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins (Ang)-1 and -2, and the tyrosine kinase receptor Tie-2 (or Tek) family [22–24]. VEGF acts as a pro-angiogenic factor on vascular endothelium, inducing proliferation and new micro-vessel formation. Meanwhile, soluble angiopoietins, which are secreted by endothelial and epithelial cells in response to stress, hypoxia and inflammation, bind to Tie-2 to fulfill their actions. Specifically, Ang-1 promotes endothelial cell survival, and anti-inflammatory and anti-permeable effects [23–25], whilst Ang-2 causes vasculature regression or a marked pro-angiogenic effect if VEGF is present. Thus, the Ang/Tie2 system seems to play an important role in vascular network remodeling [26] and in the pathogenesis and progression of NETs [27]. Furthermore, a potential relationship of this angiopoietic system with SSA and their binding to ssts may also exist [28–33], although the precise roles of the different components of these systems and the potential interactions between them are insufficiently characterized.

Therefore, in this study, we aimed to determine the presence and potential functional roles of the novel truncated sst5 variants, and their association with the VEGF and Ang/Tie system, in human GEP-NETs.

RESULTS

A total of 26 patients with GEP-NET were included in our study. Thirteen patients (50%) presented with pancreatic tumors (7 non-functional, 5 insulinomas and 1 ectopic Cushing) and the other 13 had gastrointestinal NETs. A total of 15 patients presented with metastasis, the majority of them in regional lymph nodes and/or liver. Pre-surgical CgA was determined in 22 patients, with a mean value of 19.7 ± 21.2 nmol/L (median 15.3 (0–77) nmol/L; reference range 0–6 nmol/L). Pre-surgical 5-hydroxy-indoleacetic acid was available in 8 patients, with a mean value of 17.2 ± 17.6 mg/24 h (median 7.8 (2–42) mg/24 h; reference range 2–10 mg/24 h). Immunoperoxidase staining for CgA and synaptophysin was positive in all tumor tissues. A Ki-67 immunoreactivity level $> 2\%$ was observed in 7 out of the 14 available samples (mean Ki 67 index $10.7 \pm 23.3\%$; median 2.5 (2–90)%). A detailed summary of clinical and pathological features of the patients included in our study is shown in Table 1.

SST receptors and the truncated variants are overexpressed in GEP-NETs

qPCR in GEP-NET revealed expression of sst1 in 80.8% of cases, sst2 in 92.0%, sst3 in 56.0%, sst4 in 68.0%, and sst5 in 68.0%. Receptor subtype sst1 exhibited the highest expression in GEP-NET, followed by sst2 $>$ sst4 $>$ sst3. A significant increase in expression levels of sst1, sst2 and sst3 was observed in tumor tissues in comparison to adjacent non-tumor tissues (3.88 ± 2.23 vs. 0.02 ± 0.01 ; 0.62 ± 0.08 vs. 0.24 ± 0.08 ; and 0.09 ± 0.02 vs. 0.04 ± 0.02 , respectively). However, no significant differences were observed in the expression of sst4 and sst5 between tumor and non-tumor samples (Figure 1). Interestingly, expression of the truncated subtypes sst5TMD4 and sst5TMD5 was detected in 25 and 19 cases, respectively, out of the 26 tumor samples evaluated (96.2% and 73.1%, respectively), whilst analysis of these receptors in adjacent, non-tumor/control tissues evidenced detectable expression in only 65.5% and 17.2% of cases, respectively (Table 2). Moreover, qPCR revealed an increased expression in tumor tissues in comparison to normal tissues (0.15 ± 0.05 vs. 0.08 ± 0.05 , $p < 0.01$ for sst5TMD4, and 0.011 ± 0.005 vs. 0.0006 ± 0.0004 , $p < 0.001$ for sst5TMD5) (Figure 1). No statistical differences were found between normal tissue and adjacent “normal” tissue in the vicinity of the NET (Supplementary Figure 1). However, it is worth noticing that three of these adjacent non-tumor tissues (two of which were samples from liver metastases) had a high expression (outliers by Tukey’s method) of the truncated variants. In agreement with this finding, immunohistochemical analysis of serial sections of normal (healthy) pancreas samples demonstrated that normal pancreatic islets (stained for CgA) did not show an evident sst5TMD4 specific staining (Supplementary Figure 2).

Expression of SST and CORT was detected in 66.7% and 56.0% respectively (Table 1) but no significant differences in their expression were found between tumor and non-tumor samples (Supplementary Figure 3).

sst5TMD4 is associated to enhanced malignancy features in patients with GEP-NETs and transfected cell lines

Tumor tissues from gastrointestinal origin from patients with residual disease analyzed by qPCR exhibited higher expression of sst5TMD4, compared to those tumors from patients with non-residual disease (Figure 2A). However, no significant differences were found in tumors from pancreatic origin. Furthermore, a comparative analysis of the sst subtypes and their variants in paired biopsies from primary- and metastatic-site tumor tissues from the same patients revealed an increased expression of sst5TMD4 in lymph-node metastases, in comparison to its original corresponding primary tumor (Figure 2B). In contrast, there was no difference in sst receptor expression between distant metastases and their corresponding primary tumor ($p > 0.05$; 5 pairs analyzed).

Expression of SST, CORT and both canonical and truncated ssts was also analyzed in BON-1 and QGP-1 cell lines by qPCR, which are commonly accepted as useful models for NET cell studies (Figure 3). Consistent with its origin from a human somatostatinoma, expression of SST was elevated in QGP-1 cells in comparison to CORT, but this was not the case for BON-1 cells (Figure 3A). When analyzing the different subtype receptors, we observed that sst5 showed the highest expression in both cell lines, while BON-1 presented moderate levels of both sst1 and sst3 (Figure 3A). Interestingly, both cell lines exhibited similar low levels of sst2 (Figure 3A). However, it is worth noting that truncated receptors were not detectable in any of these cell lines (Figure 3A). Thus, to further assess the potential impact of sst5TMD4 on malignancy features in NETs, we induced its overexpression in QGP-1 and BON-1 cell lines by sst5TMD4-vector transfection. qPCR of transfected cells confirmed successful transfection in both cell lines, where a high number of mRNA copies of sst5TMD4 was detected (Figure 3B and 3C – first panel). Using these cells as a model, we observed that proliferation rate at 48 h was significantly higher in BON-1 sst5TMD4-transfected cells (Figure 3B – second panel) than in controls. In contrast, no such differences in the proliferation rate were found between mock and sst5TMD4-transfected QGP-1 cells (Figure 3C – second panel). In agreement with this finding, a significant increase in Ki67 expression was observed in BON-1 sst5TMD4-transfected cells, but not in QGP-1 cells (Figure 3B and 3C – third panel). Further functional assays revealed that the presence of sst5TMD4 induced similar changes in both cell lines regarding their aggressiveness,

Table 1: Clinical, laboratory and pathological features of the 26 patients with gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors

PATIENT	S	A	Tumor Type	Stage (ENETS)	WHO Grade	Metastasis (Location)	Presurgery CgA* (nmol/L)	Presurgery Urinary 5-HIAA** (mg/24 h)	Presurgery Octreo-scan	Postsurgical SSA Treatment	Follow-up***
1	F	34	P	IIA	G2		ND	–	Negative	–	ND
2	F	41	P	IIIB	–	RLN	0	–	Negative	–	ND
3	F	67	P	I	–		0	–	–	–	ND
4	F	53	G	IIA	–		ND	–	–	–	ND
5	F	76	P	IV	–	RLN, L	5	4	Positive	+	RD
6	M	38	G	IV	–	RLN, L	0	42	Positive	+	RD
7	F	78	P	IV	–	RLN, L	33	–	Positive	+	RD
8†	M	58	P	IV	–	RLN, L, P	33	3	Positive	+	RD
9	F	78	G	IV	G1	RLN, L	6	–	Positive	+	RD
10	M	41	G	IV	G2		3	2	Negative	+	RD
11	F	71	P	I	G1		6	–	Negative	–	ND
12†	F	57	G	IV	G2	RLN, L, LM, B	59	32	Positive	+	RD
13	M	58	G	IV	G1	RLN, L	77	–	Positive	+	RD
14	F	73	P	IV	G2	L	18	–	Negative	+	RD
15	M	54	G	IV	G2	RLN, L	15	12	Negative	+	RD
16†	F	66	G	IIIB	–		1	4	Negative	–	ND
17	F	44	G	IIIB	G1		15	–	–	–	ND
18	M	58	G	IIIB	G1	RLN	1	–	–	–	ND
19	M	63	G	IV	G1	RLN, L	18	–	Positive	+	RD
20†	M	85	P	I	G3		8	–	–	–	ND
21	M	79	P	I	–		22	–	Positive	–	ND
22†	F	51	G	IV	–	RLN, L	46	–	Positive	+	RD
23	F	49	P	I	G1		22	–	–	–	ND
24	M	43	P	IIIB	–		46	–	–	–	ND
25	F	44	P	I	G2		ND	–	–	–	ND
26	M	58	G	IV	–	RLN, L	ND	40	Positive	+	RD

Abbreviations: S: sex; A: age; CgA: chromogranin A; 5-HIAA: 5-hydroxy-indoleacetic acid; SSA: somatostatin analogues; M: male; F: female; P: pancreatic NET; G: gastrointestinal NET; RLN: regional lymph nodes; L: liver; P: peritoneum; LM: lung; NA: not available. †: patients died during follow-up. *CgA Range: 1–6 nmol/L. **5-HIAA Range: 2–10 mg/24 h. ***ND: non-residual disease, if there was a complete resection after surgery and no tumor relapse was evidenced during follow-up; RD: residual disease, in cases of tumor burden after surgery or relapse of disease during follow-up. Median follow-up was 87.5 months (19–214).

Table 2: Number of samples (%) in which somatostatin receptors were detected

	Tumor tissue	Adjacent non-tumor/control tissue
sst1	21/26 (80.8)	14/28 (50.0)
sst2	23/26 (92.0)	17/28 (60.7)
sst3	14/25 (56.0)	12/26 (46.2)
sst4	17/25 (68.0)	14/26 (53.8)
sst5	17/25 (68.0)	13/26 (50.0)
sst5TMD4	25/26 (96.2)	19/29 (65.5)
sst5TMD5	19/26 (73.1)	5/29 (17.2)
SST	22/26 (84.6)	19/26 (61.5)
CORT	16/24 (66.7)	14/25 (56.0)

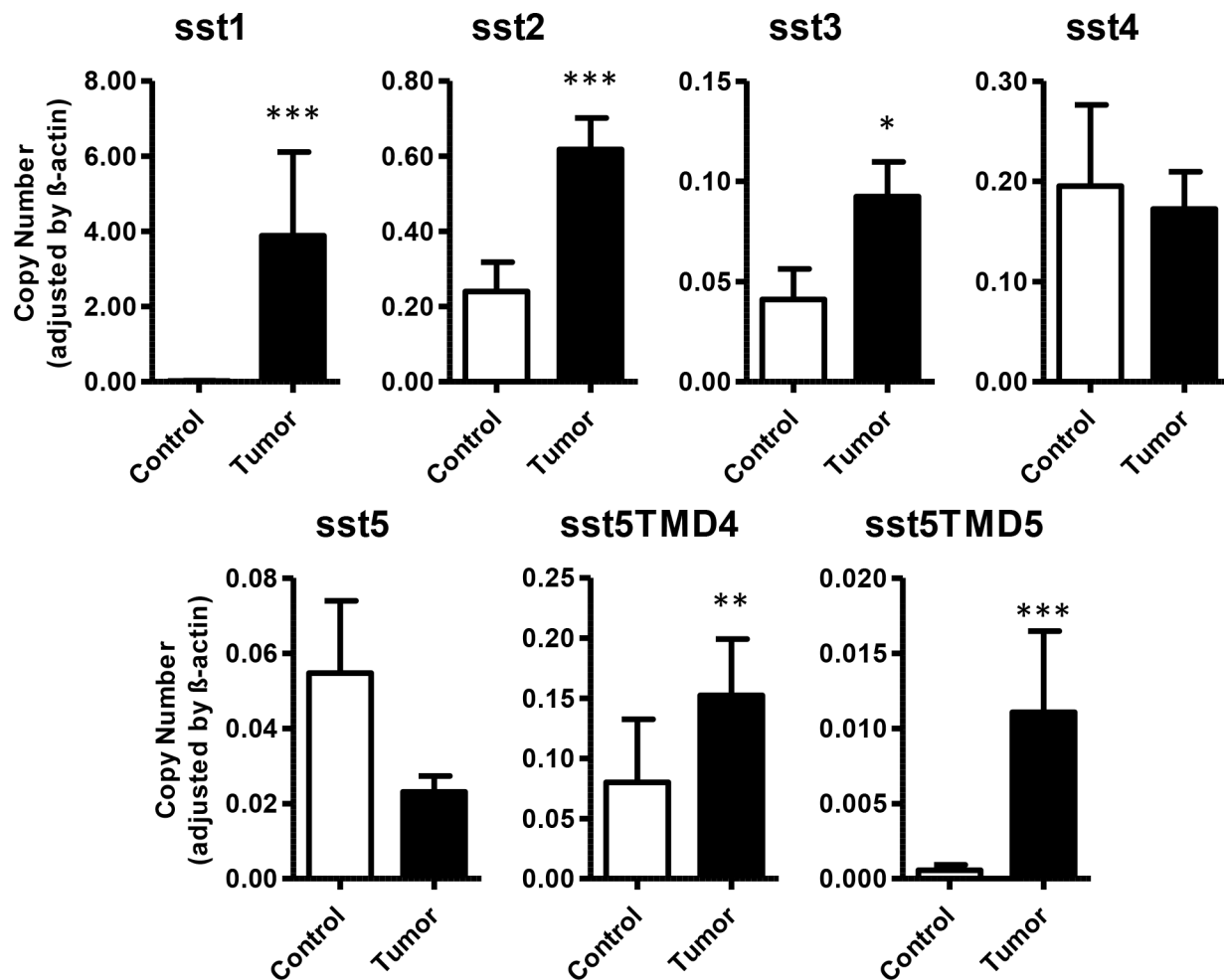


Figure 1: Expression of somatostatin receptors in GEP-NETs and adjacent non-tumor tissue. Canonical (sst1–5) and truncated (sst5TMD4 and sst5TMD5) somatostatin receptors were measured by qPCR in a set of GEP-NETs, including primary and metastatic tissue. Values represent mean \pm SEM of absolute mRNA values, adjusted by β -actin. Asterisks indicate significant differences between tumor and adjacent non-tumor tissues (p -values for t -test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

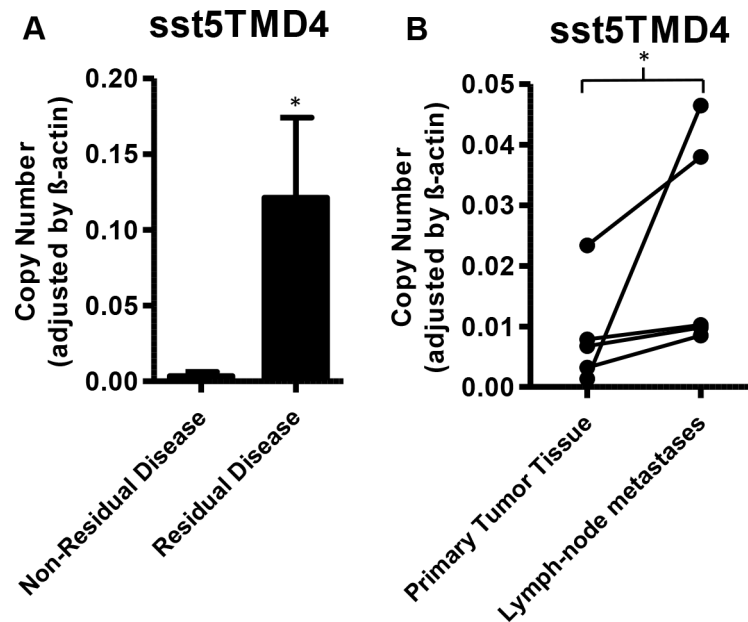


Figure 2: Expression of sst5TMD4 is associated to increased malignancy in patients with GEP-NETs. (A) mRNA expression levels of sst5TMD4 in tumor samples of gastrointestinal origin. Patients were classified according to disease status in non-residual and residual disease. Values represent mean \pm SEM of absolute mRNA values, adjusted by β -actin. (B): Paired analysis of sst5TMD4 expression in primary tumor tissue and lymph-node metastases of the same patients. Absolute mRNA level values were determined by qPCR and adjusted by β -actin. 1 was an intestinal tumor and 4 were pancreatic. Asterisks indicate significant differences (p -values for t -test: $*p < 0.05$).

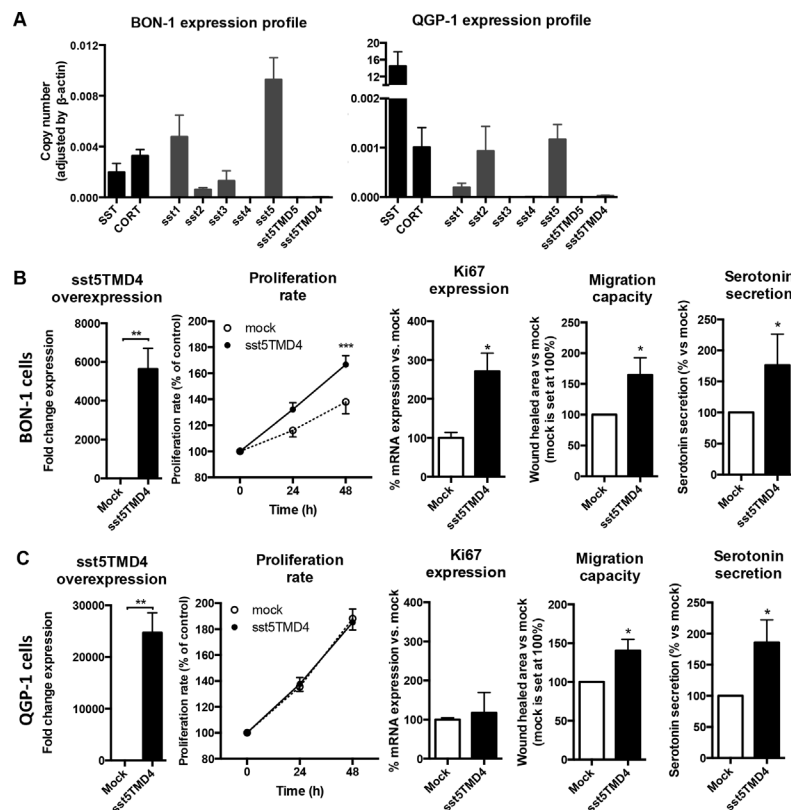


Figure 3: The presence of sst5TMD4 is associated to enhanced malignant features in NET cell lines. (A) Normalized levels of SST, CORT and sst expression in BON-1 NET cell lines and QGP-1 NET cell lines. Functional assays in sst5TMD4-transfected BON-1 cell lines (B) and QGP-1 cell lines (C) in comparison to mock cells. Panel order from left to right: sst5TMD4 overexpression; proliferation rate; Ki67 expression; migration capacity; and serotonin secretion. Values represent mean \pm standard error of the mean. Asterisks indicate significant differences (p -values for t -test: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

since we could observe that sst5TMD4-transfected cells, but not mock cells, exhibited higher migration capacity (Figure 3B and 3C – fourth panel). In addition, functional capacity of sst5TMD4 transfected cells was higher as an increased serotonin secretion in comparison to mock cells was found (Figure 3B and 3C – fifth panel).

Expression of truncated receptors correlates with expression of angiogenic markers in patients with GEP-NET

Specific qPCR analysis for angiogenic markers confirmed the presence of Ang-1, Ang-2, Tie-2 and VEGF in GEP-NET (Figure 4). In addition, serial immunohistochemistry with specific antibodies in paraffin-embedded tissues from both pancreatic and gastrointestinal NETs, evidenced positivity for Ang-1, Ang-2 Tie-2 and sst5TMD4 in tumoral cells in serial sections (Figure 5A). IHS was evaluated in 16 tumor samples (14 primary and 2 metastatic). High expression of sst5TMD4 was found in 50% (7/14) of primary tissues and 100% (2/2) of metastatic tissues. Median IHS values were 100 (range 0–300) for sst5TMD4, 208 (70–300) for Ang-1, 185 (60–270) for Ang-2, and 189 (80–285) for Tie-2. These results were corroborated by triple immunofluorescence studies (Figure 5B). We observed co-expression of sst5TMD4 (Figure 5B lane 2 and 3) and CgA in neuroendocrine tumor cells, but not in adjacent non-tumor cells (Figure 5B lane 4). In addition, co-expression of sst5TMD4 and different angiogenic markers was also evidenced in neuroendocrine cells (Figure 5B lane 6). Spearman's Rho analyses in tumor tissues revealed positive significant correlations between the four angiogenic markers, and a negative correlation of each one of them with receptor subtypes sst3 and sst4 (Figure 6). Furthermore, Ang-1, Ang2, Tie-2 and VEGF were all directly and significantly correlated

with sst5TMD4, and Tie-2 showed this same relationship with sst5TMD5 (Figure 6 – bottom left). On the contrary, however, in the few samples of adjacent non-tumor tissue in which sst5TMD4 and VEGF were detected, positive correlations were only observed for Ang-1 and Ang-2, and VEGF with Ang-1 and sst5TMD4 (Figure 6 – top right). In view of these results, the expression of these pro-angiogenic factors and the secretion of VEGF were determined in mock and sst5TMD4-transfected BON-1 and QGP-1 cells. As shown in Supplementary Figure 4, sst5TMD4 overexpression in both cell lines did not increase the expression of pro-angiogenic factors (VEGF, Ang-1 or Ang-2) or the release of VEGF to the culture media.

DISCUSSION

In this study, we have investigated the expression pattern of somatostatin receptors, particularly their truncated sst5 variants, as well as key markers of angiogenesis in a group of patients with GEP-NET. Additionally, we have evaluated their potential functional relationship. To our knowledge, this is the first time in which this has been thoroughly analyzed in a relatively large series of samples, especially when considering the limited prevalence of this uncommon heterogeneous group of neoplasms.

In the present series, we observed a differential sst expression pattern in tumor samples compared to their corresponding adjacent non-tumor tissues. Specifically, sst1–3 were significantly overexpressed in tumor samples in comparison to adjacent non-tumoral tissue. Our observations confirm previous reports and add further information regarding canonical somatostatin receptors (sst1–5) [9, 42, 43]. On this basis, it is worth emphasizing that identifying the potential influence of sst5TMD4 and sst5TMD5 in GEP-NET may entail important clinical

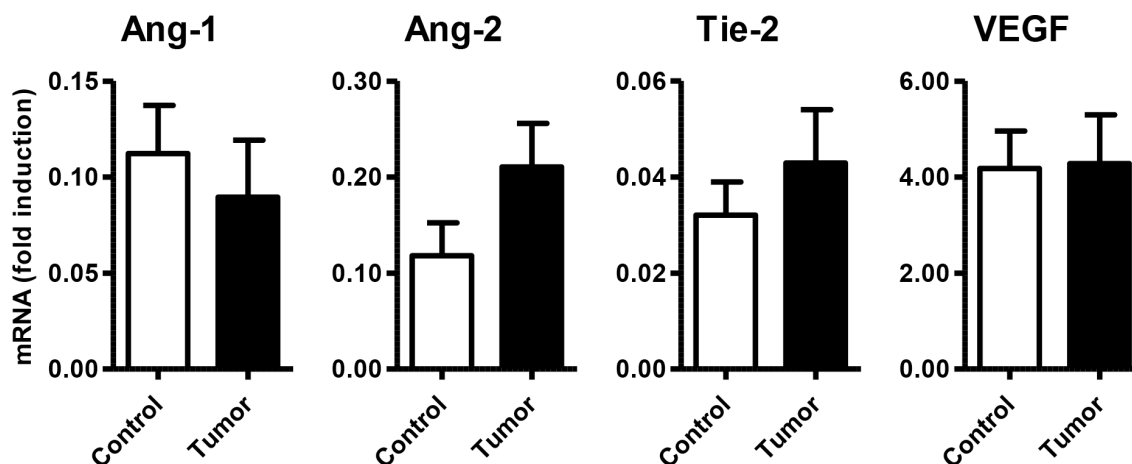


Figure 4: Expression of angiogenic molecules/markers in GEP-NETs and adjacent non-tumor tissue. mRNA expression (fold induction) of Ang-1, Ang-2, Tie-2 and VEGF was measured by qPCR in a set of GEP-NETs, including primary and metastatic tissue. Results were normalized according to the value of β -actin. Values represent mean \pm standard error of the mean.

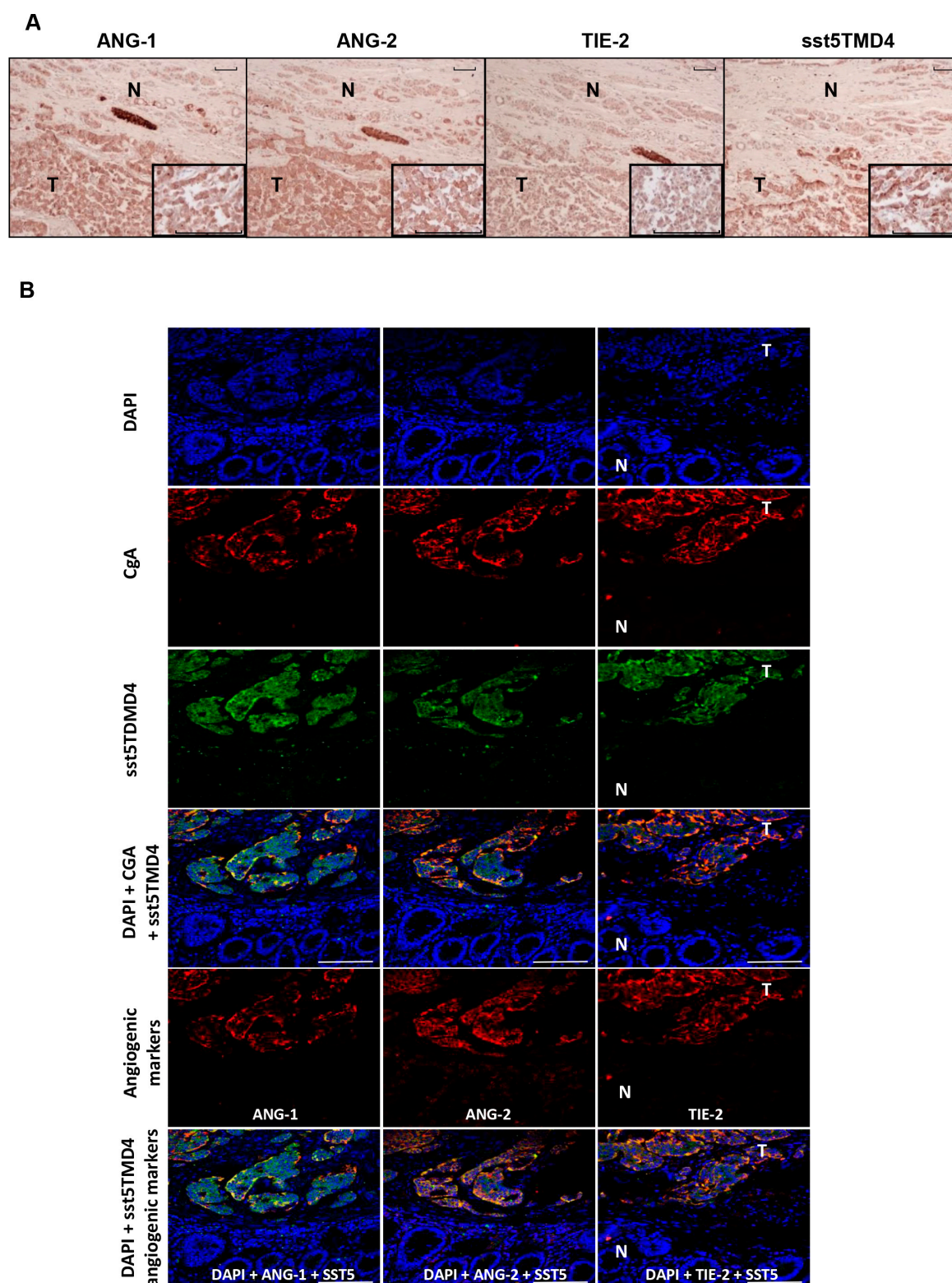


Figure 5: Expression of sst5TMD4 and co-localization with angiogenic marker in GEP-NET. (A) Analysis of expression of angiogenic molecules and sst5TMD4 by specific serial immunohistochemistry in a pancreatic NET. Original magnification $\times 100$ and $\times 400$ (insets). N: normal tissue; T: tumor tissue. For specific immunostaining techniques see the “Materials and methods” section. (B) Expression of sst5TMD4 and angiogenic molecules by triple immunofluorescence in a gastrointestinal NET sample. Original magnification $\times 400$. N: normal tissue; T: tumor tissue. For specific immunofluorescence techniques see the “Materials and methods” section. Scale bar for 100 μm is represented with a line for each Figure.

consequences, especially given the fact that SSA treatment is virtually standardized in medical practice following non-curative surgery of GEP-NET [37].

A relevant finding of our study was that these truncated variants of sst5 were associated to enhanced malignancy features. Firstly, we found an association between the expression of these canonic receptors and disease status, with sst5TMD4 being higher in those tumors from patients with gastrointestinal NETs and residual disease, compared to those with non-residual disease after surgery. Residual disease includes invasive and/or disseminated tumors, either because they were not resectable by surgery or due to tumor recurrence after a prior complete resection. Therefore, our findings suggest a possible link between sst5TMD4 and worse clinical outcome. Secondly, paired analyses identified an increased expression of sst5TMD4 in metastatic lymph nodes in comparison to their corresponding primary tumors. This suggests that primary tumors expressing sst5TMD4 could potentially develop lymph node metastasis and/or local progression more frequently. Indeed, functional assays with sst5TMD4-transfected BON-1 cells of carcinoid origin evidenced an increased proliferation rate and Ki67 expression. Interestingly, although sst5TMD4-transfected QGP-1 cells did not mimic these results, presumably due to their different nature (i.e. the considerable SST expression in the latter), both sst5TMD4-transfected NET

cell lines exhibited higher migration capacity. Moreover, transfected cells preserved their ability to secrete serotonin and, in fact, serotonin levels were significantly increased in these cells.

In a previous study, we demonstrated that transfection of sst5TMD4 in MCF-7 cells, a model for breast cancer, increased expression of Arp-2/3 (Actin-related proteins) [18], a complex that plays a major role in the regulation of actin filaments, and is associated to the enhanced ability of cancer cells to invade [44]. Also, in this same model, we found that cells with endogenous expression of sst5TMD4 showed higher levels of p-Akt and p-ERK1/2, two kinases that activate signal transduction pathways involved in proliferation, migration and phenotype transformation in cancer cells. Furthermore, we have recently reported sst5TMD4 overexpression in thyroid cancer, both medullary and non-medullary [20, 21]. sst5TMD4 overexpression in TT cells confers a greater growth capacity, modifies the cell's phenotype, decreases E-cadherin and phosphorylated β -catenin levels, increases vimentin, total β -catenin and phosphorylated GSK3B levels, and confers a greater invasion capacity [21].

There are other profoundly complex molecular pathways involved in the pathogenesis of GEP-NETs. For instance, dysregulation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-mTOR pathway [45], or aberrant

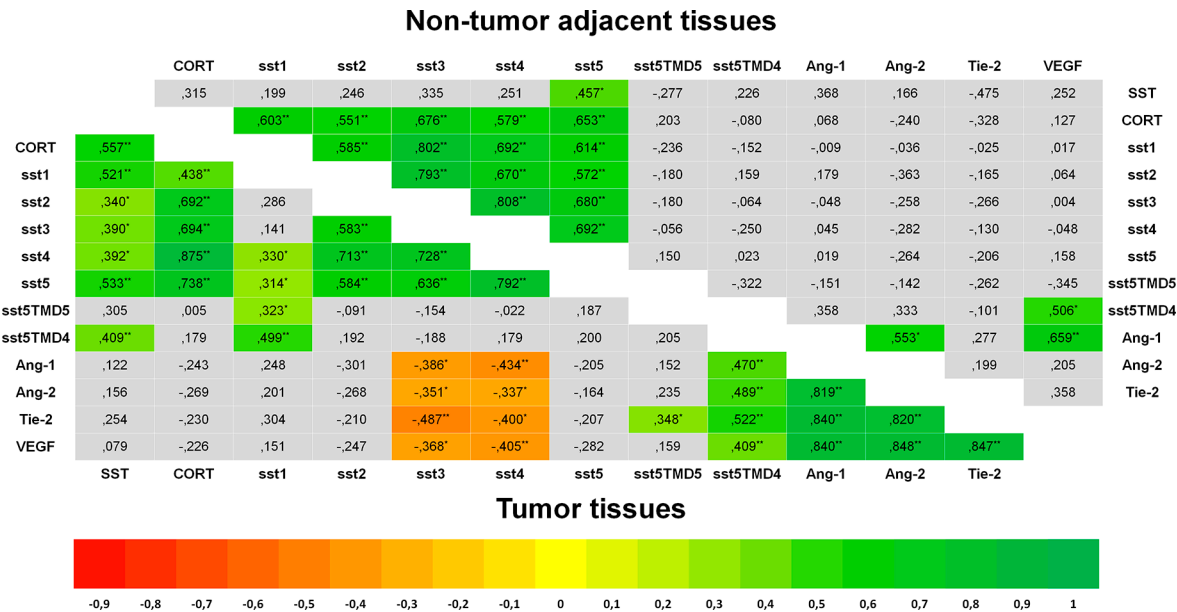


Figure 6: Heat-Maps for correlations between the expression of SST and angiogenesis systems (Spearman's Rho). Significant negative correlations are shown in red and significant positive correlations in green. Bottom left triangle shows correlations in tumor tissues and top-right hand triangle shows correlations in non-tumor adjacent tissues. In tumor samples, SST and CORT showed a significant positive correlation with sst1-5, and these subtypes were also positively correlated between themselves in a significant way. sst5TMD4 showed a positive correlation with SST and sst1, and sst5TMD5 with sst1. A positive correlation was found between the four angiogenic makers and a negative one between each one of them and sst3 and sst4. Ang-1, Ang-2, Tie-2 and VEGF were positively correlated with sst5MD4. Analyses of correlations in adjacent non-tumor tissues showed similar findings regarding CORT and sst1-5. However, SST was only correlated with sst5, and no correlation was observed between truncated receptors and the rest of subtypes. Asterisks mark significant p -values (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-sided).

signaling through G protein-coupled receptors like ssts, may lead to modulation of several key enzymes, including adenylyl cyclase, phosphotyrosine phosphatases (PTPs) and MAPKs (mitogen activated kinases) [46–48]. In this complex molecular scenario, it seems biologically plausible that sst5TMD4 plays a relevant role in the specific setting of GEP-NET, since, despite being a truncated receptor variant, it can influence and interfere with subsequent regulation of several molecular pathways. Although further investigations regarding these complex molecular relationships deem necessary to clarify this issue, sst5TMD4 may be indeed associated to tumor progression and possibly a worse clinical outcome in GEP-NET.

Given the vascular nature of NETs, which has been demonstrated in different experimental models [27, 49], angiogenesis is likely to play a relevant role in the pathogenesis and progression of GEP-NET. In this regard, we confirmed the presence of key angiogenic markers, Ang-1, Ang-2, Tie-2 and VEGF, in tumor samples from patients with GEP-NET and in transfected cell lines. Further, tumor expression of these markers showed a positive correlation between them, and a negative correlation with subtypes sst3 and sst4, in agreement with the above-mentioned studies. Interestingly, in addition, we report another novel finding: expression of the truncated variant sst5TMD4 was positively correlated with all four angiogenic markers. Immunohistochemical and immunofluorescence studies confirmed co-expression of angiogenic markers and of sst5TMD4 in CgA⁺ tumor cells. Furthermore, immunohistochemical analysis of normal (healthy) pancreatic tissue did not evidence a detectable expression of sst5TMD4 in CgA⁺ islet cells. These results further support the hypothesis of the potential interference of this variant in the putative signaling pathway of canonic non-truncated sst subtypes, as it has been proposed in earlier studies [18], as well as with angiogenic molecules, as also suggested by our present data. SSAs are known to exert an anti-angiogenic effect through their interaction with ssts, by inhibiting production and secretion of many angiogenic factors [10, 11]. In this context, previous studies have reported that signaling through sst3 down-regulates VEGF production [29], that sst1 signaling inhibits endothelial proliferation, migration and neovascularization [32, 50], and that, through sst1-3, the endothelial nitric oxide synthase (NOS) is inhibited [29, 30]. Moreover, sst2 expression has been shown to have an anti-angiogenic role in animal models of hypoxia [51], suggesting an active interplay between the somatostatin-signaling network and sustained angiogenesis. Also, somatostatin secretion is known to negatively influence VEGF production [52], and *in vitro* experiments have shown that the administration of the SSA octreotide can antagonize the hypoxia inducible factor 1 α (Hif-1 α) transcriptional activity in NET cells [8]. In line with these reports, our present findings favor

the hypothesis that sst5TMD4 could play an important role in the complex molecular network of vascularization signaling. Specifically, if we take into account the fact that sst5TMD4 interacts with sst2 [18, 19], the subsequent decreased and/or abnormal activation of sst2-associated transduction signaling pathways would plausibly lead to the development of increased vascularization, by reducing its usual antiangiogenic effect.

Although we acknowledge the limitations of our study regarding the number of samples evaluated and its retrospective observational nature, we would like to highlight the fact that, to our knowledge, this is one of the largest GEP-NET series in which such a thorough qPCR analysis of sst subtypes, including the truncated variants, and angiogenesis-related molecular markers has been performed. Besides, we should also bear in mind that analysis of surrounding non-tumoral tissue, adjacent to each corresponding tumor, is not the ideal method for comparison with tumor tissue in the case of NETs, as it has been widely recognized in this research field; this should be considered only as a reference tissue, rather than as a genuine control, but it serves for the purpose of investigations in this topic.

In conclusion, we report for the first time a significant overexpression of the truncated variants sst5TMD4 and sst5TMD5 in GEP-NET, as well as increased levels of sst5TMD4 in patients with residual gastrointestinal NET and in lymph-node metastases, in relation to its corresponding primary tumor tissue. sst5TMD4 was associated to an enhanced proliferation rate, migration capacity and serotonin secretion in NET model cell lines, and to a relationship with angiogenic markers in tumor tissues. Taken together, our results suggest that the truncated variant sst5TMD4 could be involved in local progression and worsen prognosis in GEP-NET. Results of our various analyses contribute to a better characterization and knowledge of GEP-NET, and allow more accurate and evidence-based prognostic estimations. Further long-term and prospective studies deem necessary to better understand the relevance of these ssts subtypes, specially the truncated sst5 variants, in the pathophysiology and clinical/prognostic features of GEP-NET.

MATERIALS AND METHODS

Study population

We reviewed 26 consecutive patients (15, 57.7% females, mean age 58.4 ± 14.4 years old) with GEP-NET who underwent surgery at our center from 2001 to 2009. All patients were carefully screened for the presence of other malignancies, and special attention was paid for an association with genetic syndromes (multiple endocrine neoplasia type 1, von Hippel-Lindau syndrome, tuberous sclerosis and neurofibromatosis syndromes). Only

one patient carried a mutation for multiple endocrine neoplasia type 1.

Data regarding physical examination, medical history, and laboratory work-up were obtained from routine visits using information available in clinical records. Patients were classified according to the ENETS and WHO criteria (tumor site and size, Ki67, mitotic rate and metastases) [34, 35]. Additionally, according to histopathology findings, all well-differentiated neoplasms were classified as NETs and graded G1 (Ki67 < 2%) or G2 (Ki67 2–20%), and all poorly differentiated neoplasms were designated as neuroendocrine carcinomas (NECs) and graded G3 (Ki67 > 20%) [36].

Patients were managed following current recommendations and guidelines [37]. Elective surgery was the first option of treatment in all cases and adjuvant therapy with SSAs was administered if evidence of residual disease was observed. Follow-up evaluation classified patients into two categories according to their clinical status: 1) non-residual disease, if a complete resection after surgery had been achieved and no tumor relapse was evidenced during follow-up and 2) residual disease, in cases of tumor burden after surgery or relapse of disease during follow-up. The median of follow-up was 87.5 months (19–214).

The study was approved by the local Ethical Committee and conducted in accordance to the principles of the Declaration of Helsinki, and all patients signed a written informed consent before inclusion.

Samples

A total of 72 formalin-fixed paraffin-embedded tissues were evaluated. Of these, 42 were proper tumor samples with pathological diagnosis of NET (26 from the primary site and 16 from a metastatic site), and 30 corresponded to normal tissues (26 samples from adjacent non-tumor regions and 4 normal control tissues that had been obtained from patients undergoing pancreatic, intestinal or hepatic resection), which were used as qRT-PCR negative controls. Additionally, three normal pancreatic tissues were used as immunohistochemistry negative controls. All samples were taken and managed in accordance with regulations and approval of the local Institutional Review Board.

A thorough review of hematoxylin and eosin (H&E) sections by a board-certified endocrine pathologist (MA) was carried out to ensure identification of relevant and representative areas of tumor and non-tumor tissues to proceed to RNA extraction. Simultaneously, immunohistochemical staining was performed in paraffin embedded blocks by the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method, using anti-human CgA antiserum (Biogenex Laboratories, San Ramon, CA, USA), synaptophysin, and proliferation-related Ki-67 antigen (Dako Cytomation Denmark A/S, Copenhagen, Denmark);

as well as insulin, SST, glucagon and gastrin. Tumors were then classified following current guidelines [36].

Cell culture

In order to provide a biological basis for functional assays, previously validated NET cell lines were cultured. Specifically, carcinoid BON1 cells [38] and somatostatinoma-derived QGP1 cells [39] were used. BON-1 was cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM-F12; Life Technologies, Barcelona, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 1% glutamine (Sigma-Aldrich) and 0.2% antibiotic (Gentamicin/Amphotericin B; Life Technologies). QGP-1 was maintained in RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland), supplemented with 10% FBS, 1% glutamine and 0.2% antibiotic. Both cell lines were grown at 37°C, in a humidified atmosphere with 5.0% CO₂.

RNA isolation and retrotranscription

Total RNA was isolated using TRIzol Reagent in the case of cell lines (Life Technologies) following the manufacturer's instructions and treated with DNase (Promega, Barcelona, Spain). Total RNA extraction from paraffin samples was performed using RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Limburg, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. The amount of RNA recovered (before and after DNase treatment) was determined using the NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA). Quality of RNA extracted was assessed by the same system using the Absorbance Ratio A260/280 and A260/230, requiring a minimum of 1.8 on both to perform qPCR. One microgram of RNA was reverse transcribed to cDNA using random hexamer primers [First Strand Synthesis (Thermo Scientific)].

Quantitative real time PCR (qPCR)

qPCR reactions were performed using the Brilliant III SYBR Green Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in the Stratagene Mx3000p system for sst1-5, sst5TMD4, sst5TMD5 and their ligands somatostatin (SST) and cortistatin (CORT). For each reaction, 10 µl of master mix, 0.3 µl of each primer, 8.4 µl of distilled H₂O and 1 µl of cDNA (50 ng) in a 20 µl total volume were mixed. Specifically, the program consisted of the following steps: (1) 95°C for 3 min, (2) 40 cycles of denaturing (95°C for 20 sec) and annealing/extension (61°C for 20 sec) and (3) a last cycle where final PCR products were subjected to graded temperature-dependent dissociation (55°C to 95°C, increasing 0.5°C/30 sec) to verify that only one product was amplified. Specific primers (Supplementary Table 1) for human transcripts were designed with Primer3 software and StepOne™ Real-Time PCR System software v2.3 (Applied Biosystems®, Foster

City, CA, USA). Results were validated as previously reported [40]. Samples were run in the same plate against a standard curve to estimate absolute mRNA copy number (1 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 copies of synthetic cDNA template for each transcript), and a No-RT sample as a negative control. Normalization of all genes was done according to the value of beta-actin housekeeping gene. Results were presented as total copy number, adjusted for beta-actin.

qPCR reactions for Ang-1, Ang-2, Tie-2 and VEGF were performed using LightCycler Detection System (Roche Diagnostics, Madrid, Spain) and LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics).

Immunohistochemistry and immunofluorescence studies

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded sections. Tissue sections were dewaxed with xylene and rehydrated using decreasing concentrations of alcohol. Antigen retrieval was obtained by incubation in commercial 10 mM citrate solution (pH 6.0; Master Diagnostica, Granada, Spain) using a microwave oven for 15 min at maximum power (700 W). Prior to immunostaining, slides were cooled down to room temperature and endogenous peroxidase activity was removed by incubation with a peroxidase blocking solution (Methanol 3% H_2O_2) for 25 min, under gentle stirring. Then, sections were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-sst5TMD4 antibody [12], goat polyclonal anti-Ang-1 (Cat. No. AF923, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), goat polyclonal anti-Ang-2 (Cat. No. AF623, R&D Systems), goat polyclonal anti-Tie-2 (Cat. No. AF313, R&D Systems) and mouse monoclonal anti-CgA antibody (NBP2-33198AF488, Alexa Fluor 488, Novusbio Littleton, CO, USA) subsequently incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Envision system, Dako, Barcelona, Spain). Finally, sections were developed with 3,3'-diaminobenzidine (Envision system 2-Solution DAB Kit), counterstained with Carazzi's hematoxylin, dehydrated in alcohol, cleared with xylene, and mounted. Negative control reactions were performed by omitting the primary antibody from the dilution buffer. This resulted in a completed absence of staining in all cases. Sections were analyzed in a Nikon Eclipse E400 optical microscope (Nikon, Japan).

A single histopathologist (MA), blinded to clinical data, scored all IHQ and IF cases. Tissue samples were scored manually using the immunohistochemical score method (IHS) proposed by Pinato et al. [41]. Specifically, for each sample, an IHS from 0 to 300 was assigned, based on the multiplication of the percentage of cells showing immunohistochemical expression (0–100) and the intensity of the signal (graded 1–3) in a minimum of 100 cells per

slide. Every score was then re-assessed individually, and the mean of three readings was calculated.

Next, immunofluorescence techniques were performed to examine the pattern of staining and co-expression of sst5TMD4, angiogenic markers and CgA. Tissue sections were dewaxed and antigen retrieval was performed as stated before, were blocked with normal human IgG and incubated with rabbit polyclonal anti-sst5TMD4 antibody, goat polyclonal anti-Ang-1 (Cat. No. AF923, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), goat polyclonal anti-Ang-2 (Cat. No. AF623, R&D Systems), goat polyclonal anti-Tie-2 (Cat. No. AF313, R&D Systems) and mouse monoclonal anti-CgA antibody (NBP2-33198AF488, Alexa Fluor 488, Novusbio, Littleton, CO, USA) for one hour, followed by the proper secondary AlexaFluor 647 donkey-anti-goat (DAG) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and a biotinylated Donkey Anti Rabbit was used with Streptavidin-RhoX 568 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Hoechst 33342 dye was used for cell nuclei staining, and sections were analyzed in a Leica TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Stable transfection of the truncated receptor sst5TMD4

BON1 and QGP1 cell lines were stably transfected with sst5TMD4-containing pCDNA3.1+ vector (Life Technologies) and selected as previously reported [18]. Specifically, BON1 and QGP1 cells were seeded in 6-well culture plates and transfected with sst5TMD4 or empty (mock) vectors using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) following manufacturer's instructions and selected by geneticin treatment (Gibco, Barcelona, Spain). Stably-transfected cells were characterized by qPCR.

Alamar blue proliferation assay

Cell proliferation of transfected cell lines was measured by the Alamar Blue fluorescent assay (Life Technologies). Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a density of 3,000-5,000/well. Basal, 24 h and 48 h cell viability was determined by measurement of fluorescent signal exciting at 560 nm and reading at 590 nm (Flex Station 3; Molecular Devices) at 570 nm. Specifically, the day of measurement, cells were incubated for 3 h in 10% alamar blue/ serum free-media, and then, alamar reduction was measured. Results are expressed as percentage vs. control (mock transfected cells). Medium was replaced by fresh medium immediately after each measurement. In all instances, cells were seeded per quadruplicate and all assays were repeated a minimum of four times.

Migration capacity assay

The ability of mock and sst5TMD4 stably transfected cells to migrate was evaluated by wound healing technique. Briefly, stable cells were plated at sub-confluence in 6 well plates. Confluent cells were serum-starved for 24 h and after synchronization the wound was made using a 100 μ l sterile pipette tip. Wells were rinsed in PBS and then cells were incubated for 24 h in FBS supplemented medium. Wound healing was calculated as the area of a rectangle centered in the picture 24 h after the wound vs. the area of the rectangle just after doing the wound. At least three experiments were performed in independent days, in which three random pictures along the wound were acquired per well.

In vitro secretion assay and angiogenic marker expression

To determine serotonin and VEGF secretion, mock and sst5TMD4 stably transfected BON1 and QGP-1 cells were seeded in 12 wells plates. At 70% confluence, cells were serum starved and after 24 h incubation, media were collected and stored at -20°C until measurements. Secretion of serotonin was detected using a serotonin ELISA kit (ALPCO, Salem, NH, USA) and VEGF secretion by using a VEGF ELISA Kit (Thermo Scientific). Results were expressed as percentage of serotonin or VEGF secretion vs. control (mock transfected cells). In addition VEGF, Ang-1, Ang-2 and Tie-2 were measured in cell lines by qRT-PCR. At least four experiments were performed in independent days, where the cells were seeded per duplicate.

Statistical analysis

Descriptive results were expressed as mean \pm standard deviation (SD), mean \pm standard error of the mean (SEM), or median and minimum/maximum, as appropriate. Spearman's bivariate correlations were performed for all quantitative variables and differences between groups were compared using analysis of variance (U-Mann Whitney or Kruskal-Wallis ANOVA, as appropriate). Comparison between related variables was performed using Wilcoxon sum rank test. Samples from all groups within an experiment were processed at the same time. The p -values were two-sided and statistical significance was considered when $p < 0.05$, data is presented making specification for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$. All statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (IBM SPSS Statistics Inc., Chicago, IL) and GraphPad version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Francisca Molina-Jimenez from the Instituto Universitario Princesa for kindly giving technical assistance with confocal microscopy and, to the student Kiran van der Laan for supporting some of the experimental approaches included in this study. We also warmly thank all the participants included in the study for their selfless participation.

FINANCIAL SUPPORT

This work has received the following grants: Proyectos de Investigación en Salud (FIS) PI13-01414, and PIE-0041 (funded by Instituto de Salud Carlos III) and S2011/BMD-2328 TIRONET (funded by Comunidad de Madrid) (to MM). BIO-0139, CTS-5051, CTS-1406, PI-0369-2012, BFU2010-19300, BFU2013-43282-R, PI13/00651, CIBERobn and Ayuda Merck Serono 2013 (to RML and JPC). Fellowship CTS-5051 (to AIC). "Sara Borrell" program CD11/00276 (to MDG). CIBER is an initiative of Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain.

Author contributions

MASN and ARL followed-up patients, developed the methodology of the study, acquired data, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. RML developed the methodology of the study, acquired data, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. MDG, AS and AVO developed the methodology of the study and provided technical support. MA reviewed tissue samples. EMP performed the surgery in all patients. MDC provided technical, administrative and material support. MM followed-up patients, contributed to study conception and design, interpreted data, supervised the study and revised the manuscript. JPC supervised the development of the methodology, contributed to study conception and design, interpreted data, supervised the study and revised the manuscript.

MASN, RML and ARL contributed equally to the study and should be considered co-first authors.

MM and JPC co-directed the study and should be considered co-senior authors.

CONFLICTS OF INTEREST

RML and JPC are members of the editorial board of the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. RML has received research grants from

Ipsen and speaker's fees from Novartis and Ipsen. JPC has received research grants and speaker's fees from Novartis and Ipsen, and is listed as inventor of patent PCT/ES2007/00627 for the commercial use of sst5TMD4. MDC is an employee of Ipsen. MM has received speaker's fees from Novartis and Ipsen. The rest of the authors have nothing to disclose.

REFERENCES

- Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*. 2008; 9:61–72.
- Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after “carcinoid”: Epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the united states. *J Clin Oncol*. 2008; 26:3063–72.
- Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2011; 18 1:S17–25.
- Schally AV. Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res*. 1988; 48:6977–85.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med*. 1996; 334:246–54.
- Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: A report from the PROMID study group. *J Clin Oncol*. 2009; 27:4656–63.
- Caplin ME, Pavel M, Ćwikła JB, Phan AT, Raderer M, Sedláčková E, Cadiot G, Wolin EM, Capdevila J, Wall L, Rindi G, Langley A, Martinez S, et al. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2014; 371:224–33.
- Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Coudere C, Nejari M, Vercherat C, Cordier-Bussat M, Roche C, Scoazec JY. VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Neuroendocrinology*. 2010; 91:268–78.
- Sidéris L, Dubé P, Rinke A. Antitumor effects of somatostatin analogs in neuroendocrine tumors. *Oncologist*. 2012; 17:747–55.
- Toumpanakis C, Caplin ME. Update on the role of somatostatin analogs for the treatment of patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Semin Oncol* 2013; 40:56–68.
- Keskin O, Yalcin S. A review of the use of somatostatin analogs in oncology. *Oncotargets Ther*. 2013; 6:471–83.
- Durán-Prado M, Gahete MD, Martínez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, Benito-López P, Leal A, Schulz S, Gracia-Navarro F, Malagón MM, Castaño JP. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:2634–43.
- Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Duran-Prado M, Pozo-Salas AI, Malagón MM, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Luque RM, Castaño JP. Identification and characterization of new functional truncated variants of somatostatin receptor subtype 5 in rodents. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67:1147–63.
- Zatelli MC. Antiproliferative effects of somatostatin analogs in endocrine tumours. *F1000 Med Rep*. 2009; 1.
- Theodoropoulou M, Stalla GK. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol*. 2013; 34:228–52.
- Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13:451–7.
- Bousquet C, Lasfargues C, Chalabi M, Billah SM, Susini C, Vezzosi D, Caron P, Pyronnet S. Clinical review: Current scientific rationale for the use of somatostatin analogs and mTOR inhibitors in neuroendocrine tumor therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97:727–37.
- Durán-Prado M, Gahete MD, Hergueta-Redondo M, Martínez-Fuentes AJ, Córdoba-Chacón J, Palacios J, Gracia-Navarro F, Moreno-Bueno G, Malagón MM, Luque RM, Castaño JP. The new truncated somatostatin receptor variant sst5tmd4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells. *Oncogene*. 2012; 31:2049–61.
- Durán-Prado M, Saveanu A, Luque RM, Gahete MD, Gracia-Navarro F, Jaquet P, Dufour H, Malagón MM, Culler MD, Barlier A, Castaño JP. A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5tmd4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2497–502.
- Puig-Domingo M, Luque RM, Reverter JL, López-Sánchez LM, Gahete MD, Culler MD, Díaz-Soto G, Lomeña F, Squarcia M, Mate JL, Mora M, Fernández-Cruz L, Vidal O, et al. The truncated isoform of somatostatin receptor5 (sst5tmd4) is associated with poorly differentiated thyroid cancer. *PLoS One* 2014; 9:e85527.
- Molè D, Gentilin E, Ibañez-Costa A, Gagliano T, Gahete MD, Tagliati F, Rossi R, Pelizzo MR, Pansini G, Luque RM, Castaño JP, Degli Uberti E, Zatelli MC. The expression of the truncated isoform of somatostatin receptor subtype 5 associates

- with aggressiveness in medullary thyroid carcinoma cells. *Endocrine*. 2015; 50:442–52.
22. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997; 18:4–25.
 23. Jones PF. Not just angiogenesis—wider roles for the angiopoietins. *J Pathol* 2003; 201:515–27.
 24. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res*. 2006; 312:630–41.
 25. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: A link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27:552–8.
 26. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays vegf-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:11205–10.
 27. Figueroa-Vega N, Díaz A, Adrados M, Alvarez-Escolá C, Paniagua A, Aragonés J, Martín-Pérez E, Leskela S, Moreno-Otero R, González-Amaro R, Marazuela M. The association of the angiopoietin/tie-2 system with the development of metastasis and leukocyte migration in neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17:897–908.
 28. Albini A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, Thellung S, Cai T, Noonan DM, Schettini G. Somatostatin controls kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB J*. 1999; 13:647–55.
 29. Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, Culler MD, Pfeffer U, Noonan DM, Schettini G, Albini A. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology*. 2003; 144:1574–84.
 30. Arena S, Pattarozzi A, Corsaro A, Schettini G, Florio T. Somatostatin receptor subtype-dependent regulation of nitric oxide release: Involvement of different intracellular pathways. *Mol Endocrinol*. 2005; 19:255–67.
 31. Danesi R, Agen C, Benelli U, Paolo AD, Nardini D, Bocci G, Basolo F, Campagni A, Tacca MD. Inhibition of experimental angiogenesis by the somatostatin analogue octreotide acetate (SMS 201–995). *Clin Cancer Res*. 1997; 3:265–72.
 32. Curtis SB, Hewitt J, Yakubovitz S, Anzarut A, Hsiang YN, Buchan AM. Somatostatin receptor subtype expression and function in human vascular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 278:H1815–22.
 33. Prokosch V, Fink J, Heiduschka P, Melkonyan H, Thanos S. VEGF, ang-2 and SRIF associated abnormal postnatal development of the retinal capillary network in the royal college of surgeons rat. *Exp Eye Res*. 2011; 92:128–37.
 34. Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: A consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*. 2006; 449:395–401.
 35. Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: A consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*. 2007; 451: 757–62.
 36. Rindi G, Arnold R, Bosman FT, Capella C, Klimstra DS, Klöppel G, Komminoth P, Solcia E. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. 2010; 4:13–4.
 37. Salazar R, Díaz JA, Halperin I, editors. *Manual GETNE de Diagnóstico y tratamiento de los Tumores Neuroendocrinos*. 1st ed. Sevilla: TACTICS MD; 2007.
 38. Evers BM, Townsend CM, Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*. 1991; 101:303–11.
 39. Iguchi H, Hayashi I, Kono A. A somatostatin-secreting cell line established from a human pancreatic islet cell carcinoma (somatostatinoma): Release experiment and immunohistochemical study. *Cancer Res*. 1990; 50:3691–3.
 40. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimarães RF, Marcondes JB, Chimelli LM, Fontes R, Mata PJ, Filho PN, Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2007; 156:65–74.
 41. Pinato DJ, Ramachandran R, Toussi ST, Vergine M, Ngo N, Sharma R, Lloyd T, Meeran K, Palazzo F, Martin N, Khoo B, Dina R, Tan TM. Immunohistochemical markers of the hypoxic response can identify malignancy in pheochromocytomas and paragangliomas and optimize the detection of tumours with VHL germline mutations. *Br J Cancer*. 2013; 108:429–37.
 42. Aparicio T, Ducreux M, Baudin E, Sabourin JC, De Baere T, Mitry E, Schlumberger M, Rougier P. Antitumour activity of somatostatin analogues in progressive metastatic neuroendocrine tumours. *Eur J Cancer*. 2001; 37:1014–9.
 43. Kaemmerer D, Träger T, Hoffmeister M, Sipos B, Hommann M, Sängler J, Schulz S, Lupp A. Inverse expression of somatostatin and CXCR4 chemokine receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms of different malignancy. *Oncotarget*. 2015; 6:27566–79. doi:10.18632/oncotarget.4491.
 44. Wang W, Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Segall JE, Condeelis JS. Tumor cells caught in the act of invading: Their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol*. 2005; 15:138–45.
 45. Briest F, Grabowski P. PI3K-AKT-mTOR-signaling and beyond: The complex network in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Theranostics*. 2014; 4:336–65.

46. Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C. Opportunities in somatostatin research: Biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2:999–1017.
47. Møller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1616:1–84.
48. Florio T. Somatostatin/somatostatin receptor signalling: Phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 286:40–8.
49. Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N. Role of bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:2640–5.
50. Bocci G, Culler MD, Fioravanti A, Orlandi P, Fasciani A, Colucci R, Taylor JE, Sadat D, Danesi R, Del Tacca M. *In vitro* antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. *Eur J Clin Invest.* 2007; 37:700–8.
51. Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: Results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:3480–9.
52. Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, Held-Feindt J. Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int J Cancer.* 2001; 92:545–50.

In1-ghrelin, a splice variant of ghrelin gene, is associated with the evolution and aggressiveness of human neuroendocrine tumors: Evidence from clinical, cellular and molecular parameters

Raul M. Luque^{1,*,#}, Miguel Sampedro-Núñez^{2,*}, Manuel D. Gahete¹, Ana Ramos-Leví², Alejandro Ibáñez-Costa¹, Esther Rivero-Cortés¹, Ana Serrano-Somavilla², Magdalena Adrados³, Michael D. Culler⁴, Justo P. Castaño^{1,#}, Mónica Marazuela^{2,#}

¹Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba Hospital Universitario Reina Sofía, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Córdoba, España

²Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Madrid, España

³Servicio de Patología, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Madrid, España

⁴IPSEN Bioscience, Cambridge, Massachusetts, USA

*These authors have contributed equally to this work

#These authors should be considered co-senior authors

Correspondence to:

Raúl M. Luque, e-mail: raul.luque@uco.es

Justo P. Castaño, e-mail: justo@uco.es

Mónica Marazuela, e-mail: mmarazuela.hlpr@salud.madrid.org

Keywords: ghrelin system, splicing variant, neuroendocrine tumors, aggressiveness, clinical evolution

Received: March 14, 2015

Accepted: June 06, 2015

Published: June 18, 2015

ABSTRACT

Ghrelin system comprises a complex family of peptides, receptors (GHSRs), and modifying enzymes [e.g. ghrelin-O-acyl-transferase (GOAT)] that control multiple pathophysiological processes. Aberrant alternative splicing is an emerging cancer hallmark that generates altered proteins with tumorigenic capacity. Indeed, In1-ghrelin and truncated-GHSR1b splicing variants can promote development/progression of certain endocrine-related cancers. Here, we determined the expression levels of key ghrelin system components in neuroendocrine tumor (NETs) and explored their potential functional role. Twenty-six patients with NETs were prospectively/retrospectively studied [72 samples from primary and metastatic tissues (30 normal/42 tumors)] and clinical data were obtained. The role of In1-ghrelin in aggressiveness was studied *in vitro* using NET cell lines (BON-1/QGP-1). In1-ghrelin, GOAT and GHSR1a/1b expression levels were elevated in tumoral compared to normal/adjacent tissues. Moreover, In1-ghrelin, GOAT, and GHSR1b expression levels were positively correlated within tumoral, but not within normal/adjacent samples, and were higher in patients with progressive vs. with stable/cured disease. Finally, In1-ghrelin increased aggressiveness (e.g. proliferation/migration) of NET cells. Altogether, our data strongly suggests a potential implication of ghrelin system in the pathogenesis and/or clinical outcome of NETs, and warrant further studies on their possible value for the future development of molecular biomarkers with diagnostic/prognostic/therapeutic value.

INTRODUCTION

Neuroendocrine tumors (NETs) comprise a heterogeneous group of relatively rare neoplasias with a primary site originated in the gastrointestinal tract, the pancreas and the lung [1]. Although NETs were initially thought to be uncommon, the incidence and prevalence of these tumors are increasing at a rate of 3–10% per year [2, 3]. Gastro-entero-pancreatic NETs (GEP-NETs) are the most common type of tumors, and have been classified by the World Health Organization into three categories (G1, G2 and G3) based on tumor size, histopathological differentiation, proliferation index (Ki-67), hormonal behavior, neuroendocrine biomarkers (such as serotonin and chromogranin A), direct invasion, and distant metastasis [4–6]. Although this classification is useful to predict prognosis and postoperative recurrence, diagnosis of NETs is frequently delayed several years, probably due to the rare and heterogeneous nature of NETs and the nonspecific initial symptoms. As a result, patients are often diagnosed at advanced stages, when cure is no longer possible, which leads to worsening the patient's quality of life, and to an increase in health care costs [2, 3]. Indeed, despite their identification more than a century ago, NETs remain a poorly understood disease from the clinical and molecular point of view. Accordingly, identification of new molecular diagnostic/prognostic markers, to better define their tumor behavior, from proliferation and metastasis to secretory mechanisms, deem necessary to provide clues for novel therapeutic targets [7, 8].

The ghrelin system is a multifunctional regulatory complex composed of several peptides derived from the ghrelin gene, their known and —expectably— still unknown receptors, and modifying enzymes. This system is widely distributed throughout a variety of tissues, including the gastrointestinal tract (GIT) and the lung, where it can exert a plethora of physiological and pathological actions, including the control of hormonal secretions, energy homeostasis, inflammatory processes, and tumor development and progression [9, 10]. The first peptide identified among the ghrelin gene products was native (canonical) ghrelin, a 28 amino acid (aa) hormone that can be found in acylated (AG; modified with an octanoyl group in the Ser-3) and unacylated forms. AG is the peptide able to bind and activate the only known ghrelin receptor (GHSR1a), which belongs to the family of G-protein-coupled receptors with seven transmembrane domains [9, 11]. The enzyme responsible for ghrelin acylation belongs to the super-family of membrane bound O-acyltransferases (MBOAT) and is termed MBOAT4 or, commonly, ghrelin-O-acyl-transferase (GOAT) [12, 13]. Soon after the discovery of native ghrelin, a number of alternative ghrelin gene-derived peptides and mRNA splice variants were identified [9, 14]. One of these splice forms, the In1-ghrelin variant, is also expressed in the

GIT and pancreas [15, 16]. In1-ghrelin peptide shares the initial 13 aa with native ghrelin, including the first 5-aa, which is the minimum sequence required for ghrelin acylation by GOAT and for binding and activation of GHSR1a [9, 15]. However, the aa sequence of the C-terminal tail of In1-ghrelin is totally altered due to the retention of intron 1. Interestingly, not only the ghrelin gene, but also the ghrelin receptor gene can undergo additional processes of alternative splicing to generate the GHSR1b spliced variant which, as the In1-ghrelin variant, also results from retention of an intron generating a truncated G-protein-coupled receptor isoform, with only five transmembrane domains, whose functional activities remain to be fully elucidated [9, 17].

There is growing evidence indicating that changes in the expression of specific components of this system can be associated to the development and/or progression of various cancers. Specifically, several studies have demonstrated that key components of the ghrelin system (e.g. native ghrelin, GHSR1a and GHSR1b) are expressed in various tumors including pituitary adenomas and breast and prostate cancer, thus suggesting a possible autocrine or paracrine role of ghrelin system in the pathogenesis of these tumors (for review see: [9]). In fact, our group recently described that the In1-ghrelin spliced variant could contribute to the pathogenesis of breast tumors and pituitary adenomas [13, 16]. However, there is still limited and conflicting data available on the precise functional roles that play the different components of the ghrelin system in the patho-physiology of cancer development and progression. Moreover, to the best of our knowledge, there is only limited, descriptive evidence on the presence of some components of the ghrelin system in NETs [9, 18, 19], but their exact role, relevance and implication with the development and/or progression of NETs has not been explored in detail.

In this study, we sought to analyze systematically the presence of different components of the ghrelin system (native-ghrelin, GOAT and GHSR1a) and its key splice variants (In1-ghrelin and GHSR1b) in human NETs and, compared their expression with the corresponding adjacent non-tumoral tissues. Additionally, we aimed to evaluate the functional role of In1-ghrelin variant on proliferation, migration, serotonin secretion and expression of proliferative and apoptotic markers in NET cell lines (BON-1 and QGP-1). Results from our study strongly suggest a potential role for the ghrelin system, particularly In1-ghrelin and GHSR1b, in NET pathophysiology.

RESULTS

A total of 26 patients with GEP-NETs (mean age 58.3 ± 14.4 years old; 57.7% women) were included in the study. Patients' clinical and pathological features are summarized in Table 1. Thirteen patients (50%) had

Table 1: General characteristics of the patient population and samples

Patient Baseline characteristic (n = 26)	
Gender	
Male	11 (42.3%)
Female	15 (57.7%)
Age, years	
< 55	11 (42,3%)
≥ 55	15 (57,7%)
Stage (ENETS)	
I	6 (26.1%)
II	5 (19,2%)
III	2 (7.7%)
IV	13 (50%)
Sample characteristics (n = 72)	
Sample type	
Primary tumor tissue	26 (36.1%)
Metastatic tissue	16 (22,2%)
Non-tumor adjacent tissues	30 (41,7%)
Primary site	
Pancreatic neuroendocrine tumor	13 (50%)
Carcinoid gastrointestinal NET	13 (50%)
Primary tumor size, cm	
< 3.0	16 (62.5%)
≥ 3,0	10 (38.5%)
Grading (WHO 2010 criteria)	
Low	7 (26.9%)
Intermediate	6 (26.1%)
High	1 (3.8%)
Unknown	12 (46.2%)

Abbreviations: NET = Neuroendocrine tumor; WHO = World Health Organization; GOAT = Ghrelin O-acyltransferase.

pancreatic tumors (7 non-functional, 5 insulinomas and 1 ectopic Cushing's) and the rest had gastrointestinal carcinoid tumors. Fifteen patients (58%) presented with metastases, the majority of them in regional lymph nodes and/or liver. Pre-surgical chromogranin A was determined in 22 patients, with a mean value of 19.7 ± 21.2 ng/ml [median 15.3 (0–77) ng/ml]. Immunoperoxidase staining for chromogranin A and synaptophysin was positive in all tumor tissues. A Ki-67 immunoreactivity level >2% was observed in 7 out of the 14 available samples [mean Ki-67 index $10.7 \pm 23.3\%$; median 2.5 (2–90) %].

Ghrelin system components are overexpressed in GEP-NETs in comparison to normal tissues

qPCR analysis performed in GEP-NET tissue samples revealed that native ghrelin was expressed in 35.7% ($n = 15/42$), its cognate GHSR1a receptor in 88.1% ($n = 37/42$) and GOAT in 85.7% ($n = 36/42$) (Table 2). Interestingly, we found a high expression of the splicing variants of the ghrelin system in GEP-NETs. Specifically, the In1-ghrelin variant was expressed in more GEP-NET samples than native ghrelin [81% ($n = 34/42$) vs. 35.7% ($n = 15/42$); mean mRNA copy number: 0.038 ± 0.007].

Table 2: Percentage (%) of control normal-adjacent tissues and NET tissues expressing the components of the ghrelin system and mean mRNA copy number of each component ± SEM (adjusted by β-actin expression)

	<i>GOAT</i>	<i>Ghrelin</i>	<i>In1-ghrelin</i>	<i>GHSR1a</i>	<i>GHSR1b</i>
Control	22/30 (73.3%)	6/30 (20.0%)	15/30 (50.0%)	8/25 (32.0%)	21/30 (70.0%)
	0.259 ± 0.077	0.003 ± 0.002	0.008 ± 0.003	0.093 ± 0.063	0.409 ± 0.111
Tumor	36/42 (85.7%)	15/42 (35.7%)	34/42 (80.9%)	37/42 (88.1%)	39/42 (92.9%)
	0.3499 ± 0.055	0.0028 ± 0.002	0.0384 ± 0.007	0.2158 ± 0.097	1.764 ± 0.400

vs. 0.00283 ± 0.00025 , respectively; 13-fold higher, ($p < 0.001$; Table 2). Similarly, although truncated GHSR1b variant was expressed in a similar percentage of GEP-NET tissues as GHSR1a [92.9% ($n = 39/42$) vs. 88.1% ($n = 37/42$)], the expression levels of this spliced receptor variant were significantly higher than the expression of GHSR1a in GEP-NETs (mean mRNA copy number: 1.764 ± 0.400 vs. 0.215 ± 0.098 , respectively; 8-fold higher, ($p < 0.001$; Table 2).

We observed a striking dysregulation of the expression patterns of several components of the ghrelin system in GEP-NETs in comparison to non-tumor adjacent tissues. Specifically, whereas mean mRNA levels of native ghrelin were not different between tumoral and non-tumoral adjacent samples (Figure 1A), we found that mean expression levels of GHSR1a, GOAT, and also of the splice variants In1-ghrelin and GHSR1b, were significantly increased in GEP-NET tissues compared to the non-tumoral adjacent regions (Figure 1A). Interestingly, mRNA expression levels of In1-ghrelin strongly correlated with those of GOAT in GEP-NETs (Figure 1B). This finding was not observed, however, for native ghrelin. In addition, whereas GHSR1a mRNA levels did not correlate with native ghrelin or In1-ghrelin levels, we found that expression levels of GHSR1b paralleled those of In1-ghrelin. However, once again, this was not observed for native ghrelin (Figure 1C). Furthermore, GHSR1b and GOAT expression levels were positively correlated in tumors (Figure 1D).

Further sub-analyses of the expression of the ghrelin components according to tumor site (primary or metastatic tissues) showed a consistent increase of In1-ghrelin as well as of the two ghrelin receptors (GHSR1a and GHSR1b) in both categories, while GOAT and native ghrelin expression levels were elevated only in metastatic tissues (Supplemental Figure 1).

In1-ghrelin, GOAT and GHSR1b expression is associated to worse patient outcome

Patients were grouped into three categories according to their clinical outcome (complete tumor remission, stable disease or progressive disease), and the relevance of the increased expression levels observed

for some of the components of the ghrelin system was evaluated accordingly. No significant differences were found in mean expression levels of native ghrelin and GHSR1a between the three groups (Figure 2A). In contrast, higher mRNA levels of GOAT, In1-ghrelin and GHSR1b were associated to a worse clinical outcome (Kruskall-Wallis one-way ANOVA test: $p = 0.014$, $p = 0.004$ and $p = 0.014$, respectively; Figure 2A). These differences were particularly noticeable when comparing tumor samples from patients with complete remission and those with progressive disease (by Dunn's multiple comparisons test: $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$; or by Student's t -test: $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively; Figure 2A). In fact, ROC analysis of all the components of the ghrelin system showed that expression of GOAT, GHSR1b, and, specially, In1-ghrelin, discriminated between categories of clinical outcome (Figure 2B). Conversely, native ghrelin and GHSR1a expression showed a poor ability to distinguish between the two diagnostic groups (ROC curves similar to the reference line; data not shown). Importantly, as illustrated in Figures 2A and 2B, expression of the In1-ghrelin variant was the best and most accurate marker to distinguish between patients presenting complete disease remission or progressive disease. Furthermore, In1-ghrelin expression levels, but not those of GOAT or GHSR1b, were also significantly higher in tumor samples from patients with stable disease, compared to those with complete disease remission ($p < 0.05$ by Student's t -test; Figure 2A). Taken together, these findings invite to hypothesize that In1-ghrelin could serve as a potential new molecular diagnostic/prognostic marker and/or a tool to identify new therapeutic targets for the treatment of GEP-NETs and, hence, should be explored further.

Expression of the splice variants of the ghrelin system, especially In1-ghrelin, is associated with features of malignancy in patients with GEP-NETs

Clinical outcome of patients with GEP-NETs is believed to depend on the aggressiveness of the tumor itself. Therefore, we explored the putative associations between the expression levels of the ghrelin system

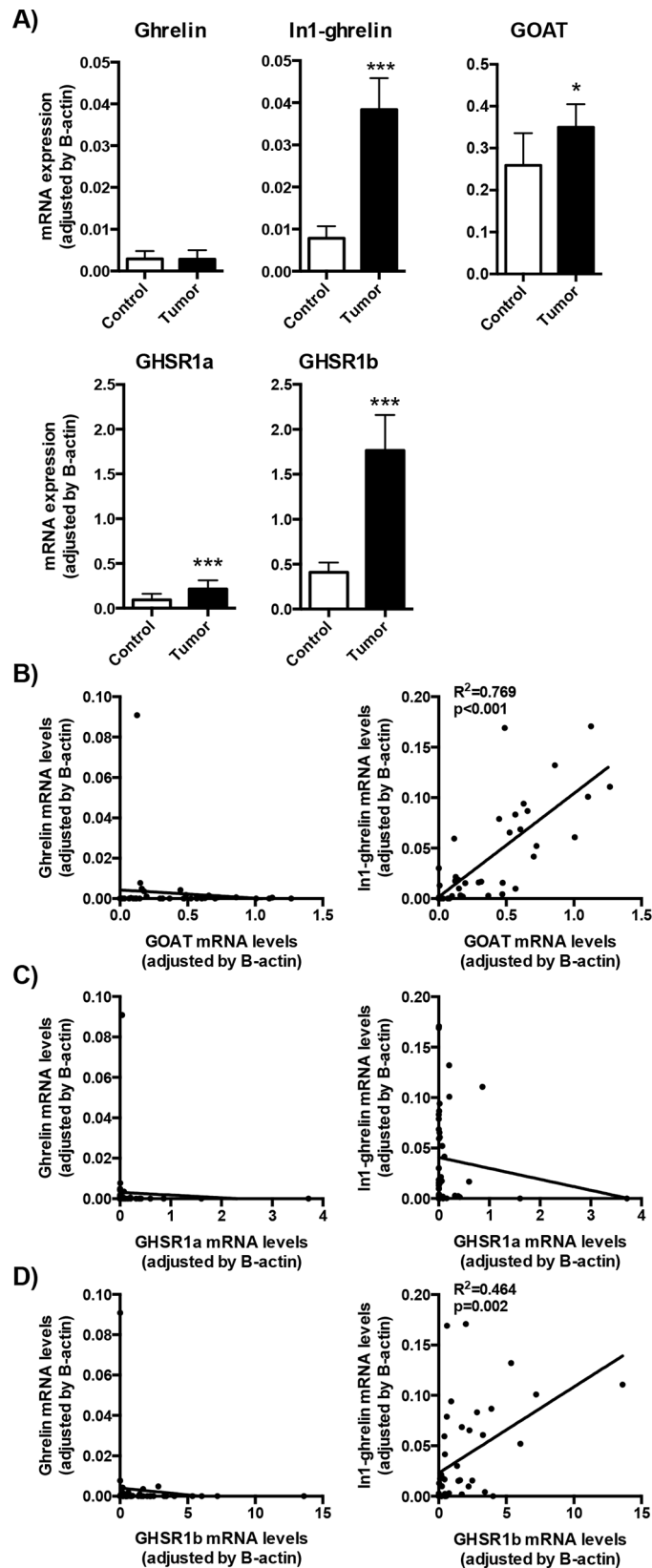


Figure 1: Expression of ghrelin system components in NETs. A. The mRNA expression levels of the ghrelin system components (ghrelin, In1-ghrelin, GOAT, GHSR1a and GHSR1b) were determined by qPCR in a battery of NETs and compared to their adjacent non-tumoral control tissues. B. Correlation between ghrelin or In1-ghrelin levels and GOAT expression levels in NET samples. Correlation between ghrelin or In1-ghrelin levels and GHSR1a C. or GHSR1b D. expression levels in NET samples. Data represent mean \pm SEM. Asterisks (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) indicate values that significantly differ from the adjacent non-tumoral control tissues.

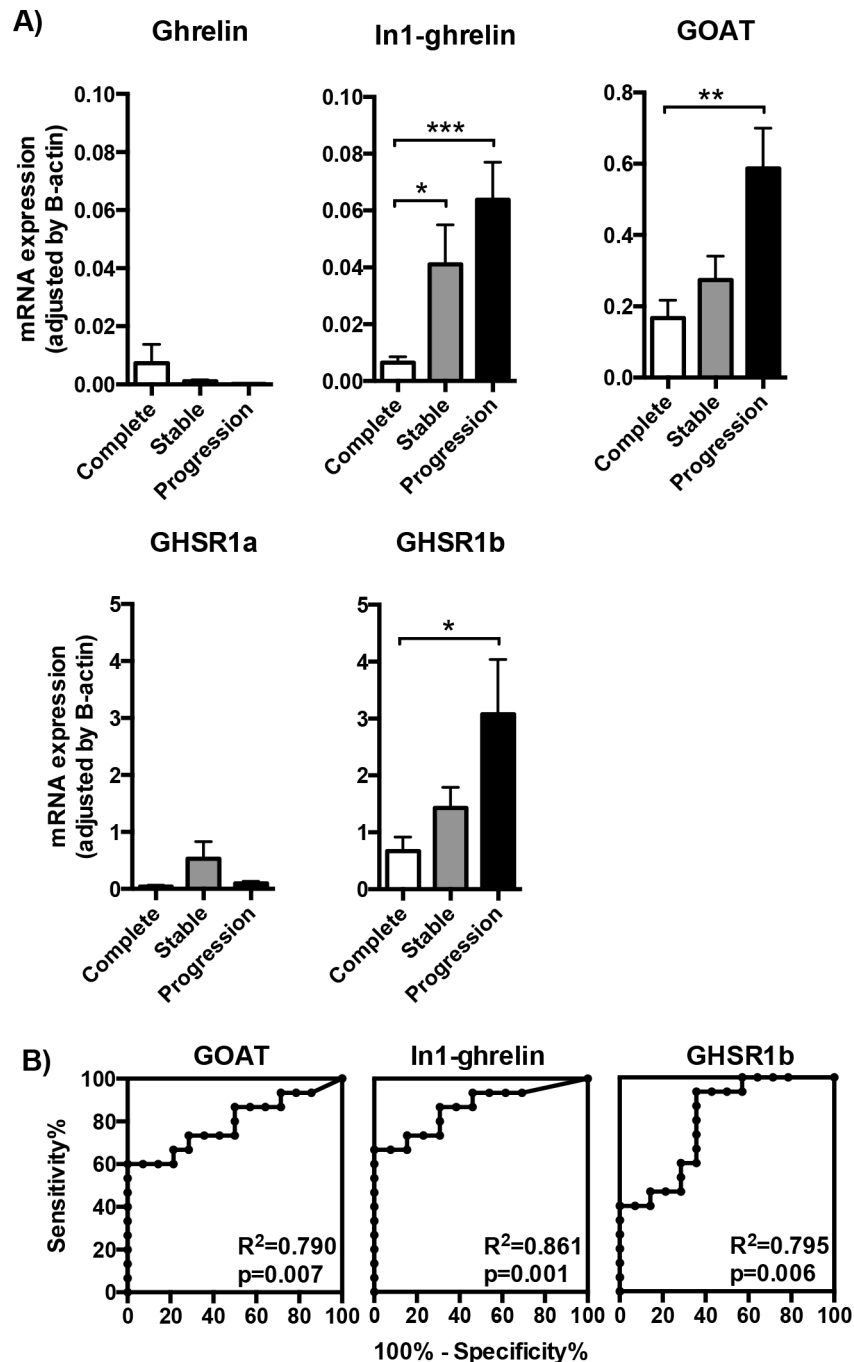


Figure 2: Expression of ghrelin system components in the tumoral samples of patients with different outcome. **A.** The mRNA expression levels of the ghrelin system components (ghrelin, In1-ghrelin, GOAT, GHSR1a and GHSR1b) determined by qPCR in the tumoral samples were classified depending on the outcome of the patient (complete remission, stable disease or progression of the tumor). **B.** Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis to determine the accuracy of ghrelin system components (GOAT, In1-ghrelin and GHSR1b) as diagnostic test to discriminate between NETs with complete remission or progressive disease [the closer the ROC curve is to the upper left corner of the graphic (i.e., higher sensitivity and specificity), the higher the overall accuracy of the marker used]. Data represent mean \pm SEM. Asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) indicate values that significantly differ from the NETs with complete remission.

components in GEP-NET tumor samples and the corresponding clinical, anatomical and pathological characteristics of patients. In this regard, we evaluated expression levels in primary tumors of patients who

developed metastases, compared to those who did not. Interestingly, we found that only the expression levels of the spliced variants of the ghrelin system, In1-ghrelin and GHSR1b, were significantly elevated in the primary

tumors of patients that developed metastasis, as compared to those that did not (Figure 3A). In fact, although similar, but not statistically significant, trends were observed for GHSR1a and GOAT expression (Figure 3A), ROC analysis of all these components confirmed that only the expression of In1-ghrelin and GHSR1b splicing variants could discriminate between these two diagnostic groups (development of metastasis vs. no metastases; Figure 3B).

Because expression of the In1-ghrelin variant was consistently elevated in all GEP-NET types (primary and metastasis tissues), and that it was associated to expression levels of GOAT and GHSR1b in GEP-NET tissues, we deemed of great interest to explore the putative role of this novel In1-ghrelin variant in the pathophysiology of these tumors, especially given the fact that this was not observed for native ghrelin.

Overexpression of In1-ghrelin is associated with increasing features of aggressiveness in human NET cells

To examine the possible functional effects of the In1-ghrelin variant on NET cells malignancy features, we used two commonly accepted models for NET cell studies: BON-1 and QGP-1 cell lines (Figure 4). qPCR analysis performed in both cell lines revealed that the majority of the components of the ghrelin system were expressed, at different levels, except for GHSR1a (i.e. its expression was under the detection limit) (Figure 4A and 4B). In particular, In1-ghrelin was the ghrelin system component most abundantly expressed in QGP-1 cells, followed by native ghrelin and GOAT, and by a modestly expressed GHSR1b (Figure 4A).

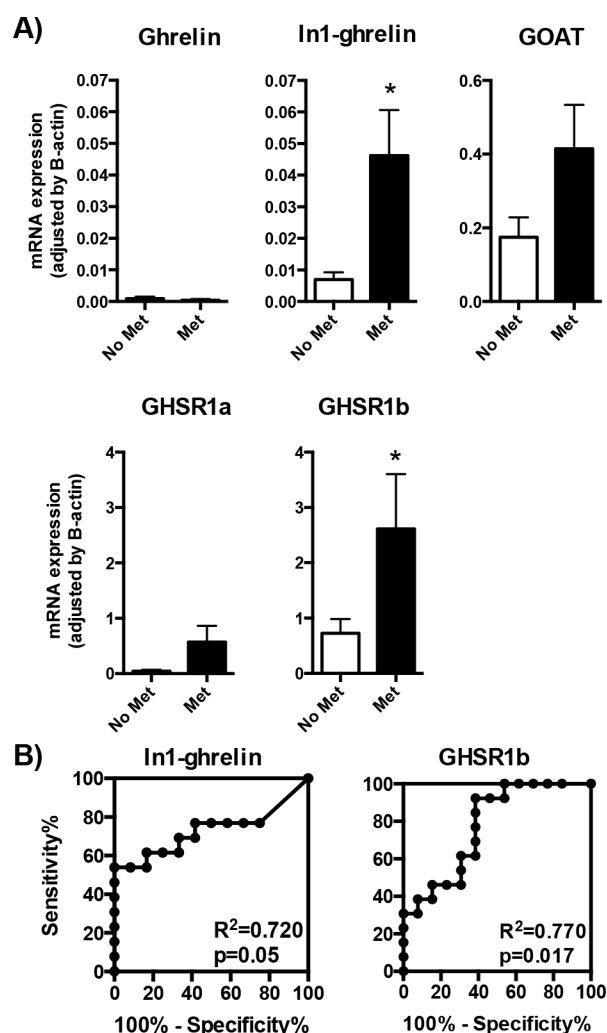


Figure 3: Expression of ghrelin system components in primary NETs with or without metastasis. A. The mRNA expression levels of the ghrelin system components (ghrelin, In1-ghrelin, GOAT, GHSR1a and GHSR1b) determined by qPCR in the tumoral samples were classified depending on the presence or absence of metastasis. **B.** Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis to determine the accuracy of ghrelin system components (In1-ghrelin and GHSR1b) as diagnostic test to discriminate between the metastatic capacities of the NETs. Data represent mean \pm SEM. Asterisks ($*p < 0.05$) indicate values that significantly differ from the NETs without metastasis.

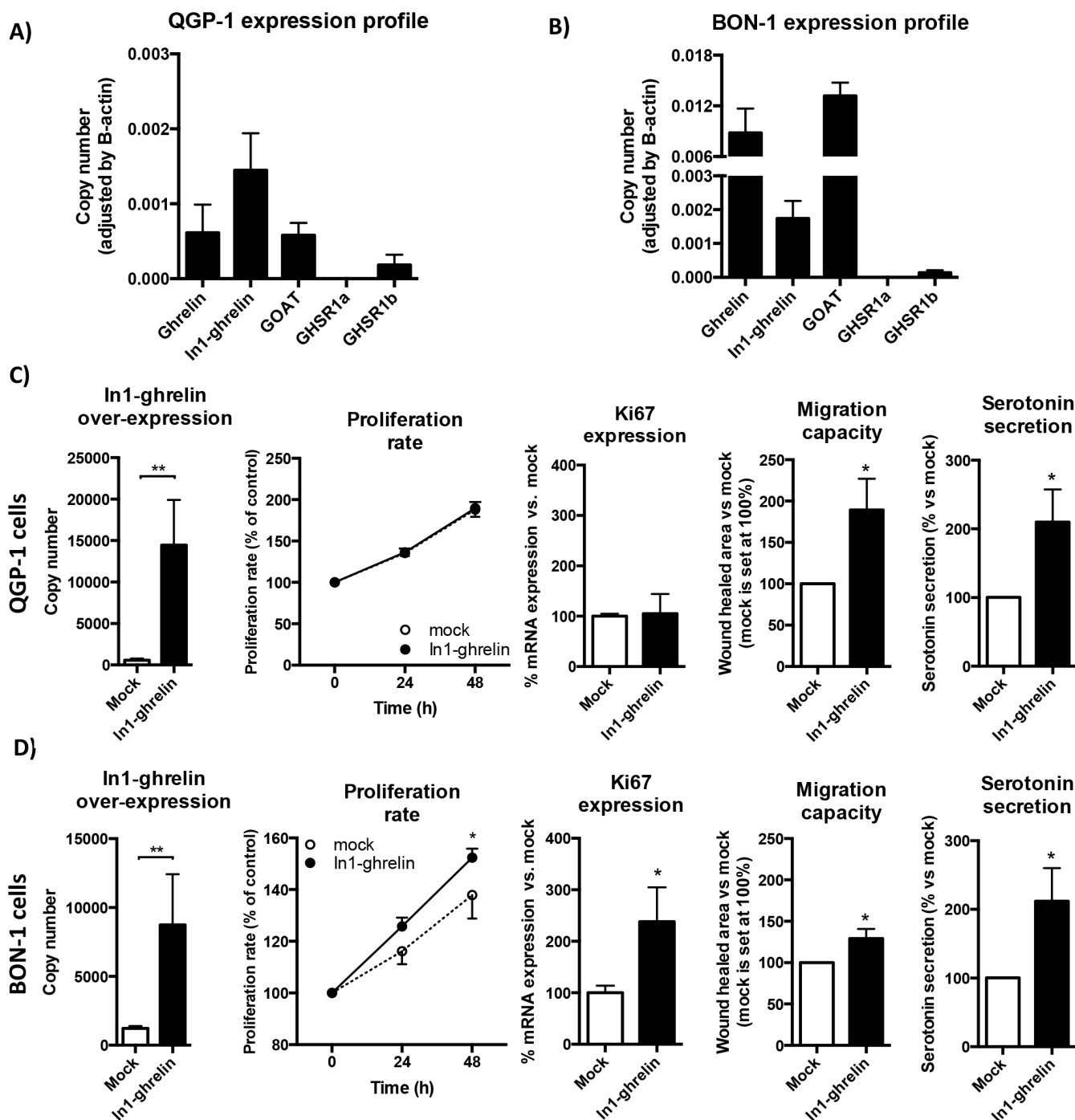


Figure 4: Effects of In1-ghrelin overexpression in NET-derived cell lines. **A.** Normalized levels of ghrelin system components (ghrelin, In1-ghrelin, GOAT, GHSR1a and GHSR1b) in QGP-1 NET cell lines and **B.** BON-1 NET cell lines. Functional assays in In1-ghrelin transfected QGP-1 cell lines **C.** and BON-1 cell lines **D.** compared to mock control cells. Panel order from left to right: In1-ghrelin overexpression; proliferation rate; Ki67 expression; migration capacity; and serotonin secretion. Data represent mean \pm SEM of $n = 3 - 6$ independent experiments. Asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) indicate values that significantly differ from mock control cells.

Conversely, native ghrelin and GOAT were the most predominantly expressed components of the ghrelin system in BON-1 cells, followed by In1-ghrelin expression, and by a much lower GHSR1b expression level (Figure 4B).

We then overexpressed In1-ghrelin in both cell lines by transfection with a specific expression vector

containing the appropriate coding region of the In1-ghrelin variant. We verified an increased number of mRNA copies of In1-ghrelin compared to mock-transfected controls by qPCR (Figures 4C and 4D: first left panels). This strategy revealed that In1-ghrelin overexpression increased the proliferation rate of BON-1, but not of QGP-1 cells,

compared to their corresponding mock-transfected control cells (Figures 4D and 4C, respectively: second panels). In agreement with this finding, a significant increase in the expression of the proliferation marker Ki67 was observed in BON-1, but not in QGP-1, cells transfected with In1-ghrelin compared with mock-transfected cells (Figures 4D and 4C, respectively: third panels). Additionally, we also investigated whether In1-ghrelin overexpression exerted apoptotic effects by measuring the expression levels of two apoptosis-related markers, TP53 and Bcl2, in both cell lines. Our data indicated that overexpression of In1-ghrelin did not alter the expression levels of these two apoptosis markers in NET cell lines (Supplemental Figure 2), suggesting that In1-ghrelin is not involved in the control of the expression of these apoptosis-related marker.

Interestingly, further functional assays revealed that overexpression of In1-ghrelin significantly stimulated the migration capacity of both QGP-1 and BON-1 cells, as assessed by wound healing technique (Figures 4C and 4D, respectively: fourth panels). Furthermore, In1-ghrelin overexpression also increased significantly serotonin secretion in both cell lines as compared to their corresponding mock-transfected control cells (Figures 4C and 4D: fifth panels).

DISCUSSION

NETs have been commonly considered a rare and heterogeneous group of neoplasms [1]. However, their prevalence is higher than previously thought according to recent data from the US Surveillance Epidemiology and End Results [2]. Although in recent years there has been significant progress in NET medical treatment, with the emergence of multiple active therapies [20], these strategies are still limited and unsatisfactory. Therefore, it is crucial to identify new molecular biomarkers for these tumors, which would help to refine their diagnosis, to better predict their prognosis and tumor behavior, and provide tools to develop novel therapeutic targets.

Earlier studies suggested that the ghrelin system, which participates in various endocrine-related tumors [9, 10, 21], might also play a relevant role in NET pathophysiology. Indeed, some of its components have been previously detected in normal and tumoral tissues of the GIT [9, 22]. Specifically, ghrelin and GHSR1a are expressed in gastric [18, 23–25], intestinal [23, 26], pancreatic [18, 25, 27] and/or lung [28] NETs, although the expression levels and the percentage of tumors expressing native-ghrelin or GHSR1a varied substantially depending on the tissue analyzed, and on the detection method used. Moreover, to date, it is still unclear whether the expression profiles of these or other components of the ghrelin system are altered in NETs. Actually, to the best of our knowledge, the present report provides the first systematic analysis of the expression of different

components of the ghrelin system in human NET tissues as compared to their corresponding adjacent non-tumoral tissues, and in relation to clinical parameters of the patients.

Our results revealed that the expression profile of ghrelin system is markedly altered in NETs compared with control adjacent tissues, and that this is dependent on the specific component examined, and on the tumor site analyzed (primary vs. metastatic tissues). Specifically, In1-ghrelin, GHSR1a/1b and GOAT, but not of native-ghrelin, expression was increased in NETs compared with control adjacent tissues, both in primary and in metastatic sites. Moreover, expression was higher in metastatic tissue when compared to the primary site, suggesting that these components might exert a functional role in the NETs pathology. Interestingly, results differed in the case of GOAT, which was only overexpressed in metastatic tissues. Our results further indicate that In1-ghrelin is the variant predominantly expressed in NET tissues, in terms of number of NET samples and expression levels (i.e. 13-fold higher than those of native-ghrelin). This observation compares favorably with previous reports indicating that In1-ghrelin, but not native-ghrelin, expression is consistently increased in other endocrine-related tumors compared with normal tissues, including human breast [15] and pituitary [21] tumors. Hence, it seems reasonable to suggest that overexpression of this In1-ghrelin might be a common cellular/molecular signature across various endocrine-related tumors.

This study also demonstrates that a high proportion of NETs express GOAT, an enzyme that acylates native-ghrelin, and presumably also In1-ghrelin variant, which is an essential step for ghrelin to bind GHSR1a and to exert thereby its neuroendocrine activities [12, 13, 21]. The remarkable expression of GOAT in NET tissues compared with that in adjacent-control tissues, is in accordance with recent findings in breast cancer tissues where GOAT mRNA was highly expressed compared with control tissues [15], like in prostate cancer cell lines compared with normal prostate epithelial-derived cell lines [29]. Expression of GOAT enzyme, as well as of native-ghrelin and In1-ghrelin in NETs, supports the notion that the ghrelin axis might exert active autocrine/paracrine roles in these tissues. Actually, expression levels of GOAT in NETs positively correlated with In1-ghrelin, but not with native ghrelin expression, suggesting that In1-ghrelin might be the main ghrelin gene variant functionally linked to GOAT in these tumors, and reinforcing the idea that an autocrine/paracrine circuit involving these two components may operate in NETs, especially in metastatic tissues, where both components were highly expressed compared with adjacent-control tissues.

Regarding the expression of receptors, our analyses revealed that NETs not only expressed the canonical, full length GHSR1a, but also GHSR1b, which is in line with previous reports showing that the latter is present

in intestinal carcinoids [23] or pancreatic NETs [25]. Moreover, our study is the first to demonstrate that expression levels of both receptors are significantly elevated in NET tissues compared with non-tumoral adjacent tissues. Specifically, the splice variant GHSR1b was the dominant ghrelin receptor isoform expressed in NET tissues, as its mRNA levels were markedly higher (8-fold) than those of GHSR1a. This data is reminiscent of earlier reports showing that GHSR1b seems to be selectively expressed in prostate hyperplasia [30], as well as in breast carcinomas [15], where its abundance shows a strong correlation with In1-ghrelin expression levels. Interestingly, although GHSR1b expression levels in NETs were significantly higher than those of GHSR1a, both receptors were expressed in a similar percentage of tumor tissues, where their expression levels tended to correlate ($p = 0.06$), suggesting a potential functional association between both receptors in NETs. Although the actual (patho)physiological role of GHSR1b is still unknown, it has been reported that GHSR1b can heterodimerize with GHSR1a, promoting translocation of the receptor complexes, and acting thereby as a dominant-negative receptor for the canonical signaling functions of GHSR1a [31, 32]. In this scenario, it is tempting to speculate that the striking change in the mRNA pattern of GHSR1a and GHSR1b found in NET tissues (i.e. significant high level of GHSR1b relative to GHSR1a) may translate into a relevant functional role in this pathology (e.g. by disrupting the normal ghrelin/GHSR1a signaling). In fact, whereas GHSR1a mRNA levels do not correlate with those of native ghrelin or In1-ghrelin in NETs, GHSR1b expression levels did parallel those of In1-ghrelin ($p = 0.002$), but not those of native ghrelin. This suggests that In1-ghrelin could be a relevant ghrelin gene-derived variant functionally linked to other components of the ghrelin system [i.e. with GOAT (as discussed previously) and GHSR1b] in NETs and, that the cellular machinery responsible for the intron retention processes is altered [33].

Further support to the notion that the splice variants In1-ghrelin and GHSR1b may promote NETs pathogenesis derives from three lines of evidence. First, from the observation that there is not only a quantitative predominance of the expression of these splice variants over their respective canonical counterparts in NET tissues, but also that the ratios between In1-ghrelin/native-ghrelin, and between GHSR1b/GHSR1a are augmented in NET tissues as compared with that found in adjacent-control tissues (~5-fold and 2-fold higher for In1-ghrelin/native-ghrelin and GHSR1b/GHSR1a ratio, respectively). The second line of support is provided by the direct association of In1-ghrelin, GHSR1b and GOAT expression levels—but not of native-ghrelin and GHSR1a—with a worse clinical outcome, i.e. tumors of patients with progressive disease have higher levels of these components vs. patients

with complete remission of the tumor. These results are also consistent with previous reports showing that native-ghrelin expression in pancreatic NETs is not clinically associated with tumor size, grade or stage [32], and with studies showing that plasma native-ghrelin concentrations lie within the normal range in patients with NETs [34, 40, 41] (native-ghrelin elevation has only been reported in three cases of ghrelinomas [41–43]). Additionally, we found that only the expression levels of In1-ghrelin and GHSR1b were significantly elevated in the primary tumors of patients that developed metastasis, as compared to those that did not. And thirdly, ROC curve analysis indicated that only the expression of In1-ghrelin and GHSR1b could discriminate between the different diagnostic groups according to follow-up outcome (tumor remission, stable disease, or progressive disease) and malignancy features (expression in primary tumors of patients that developed metastasis compared to those that did not develop metastasis), whereas GOAT expression could only discriminate between the diagnostic groups of clinical outcome of patients. These findings suggest a putative utility of these splicing variants as tools to identify novel biomarkers to refine diagnosis and predict prognosis of NETs, and for the development of new therapeutic tools for the management of human NETs.

Based on previous results showing that In1-ghrelin variant can promote features of aggressiveness in breast cancer [13] and pituitary tumor cells [16], and on the results of our study, which demonstrated that the expression of the In1-ghrelin variant is a valuable marker to classify patients according to prognosis, we further explored the functional role of In1-ghrelin in two NET cell models. *In vitro* data revealed that overexpression of In1-ghrelin enhanced features of aggressiveness in human NET cells (i.e. increased proliferation rate and expression of the Ki67, as well as migration capacity and serotonin secretion) which demonstrates that this splice variant is functionally active in NET cells. These results support and extend previous data from our group showing that In1-ghrelin influences key, clinically relevant processes, such as proliferation or hormone secretion in other endocrine-related pathologies as breast cancer [15] and pituitary adenomas [21], further suggesting that overexpression of In1-ghrelin might be a common cellular/molecular signature across different endocrine-related tumors that is directly associated to the aggressive features of these pathologies.

Altogether, our results indicate that the ghrelin system, specially the splicing variants (In1-ghrelin and GHSR1b), is dysregulated in human NETs, where they may exert a relevant pathophysiological role. Specifically, the observations indicating that In1-ghrelin expression is correlated with a worse patient's outcome, increased malignancy, and features of aggressiveness in human NET cells support the idea that this system could potentiate the pathogenesis of NETs, and may provide useful tools to

identify new diagnostic/prognostic biomarkers and explore novel therapeutic molecular targets in human NETs.

MATERIALS AND METHODS

Study population and samples

We collected data from 26 patients with GEP-NET who underwent surgery at our Hospital from 2001 to 2009 [mean age 58.4 ± 14.4 years, 15 females (57.7%)]. All patients were carefully screened for the presence of other malignancies, and special attention was paid to exclude an association with neurofibromatosis, multiple endocrine neoplasia type 1, or Von Hippel-Lindau syndrome. Only one patient was carrier of a MEN-1 gene mutation.

We used clinical records to collect full medical history of all patients. Subjects were classified following ENETS and WHO criteria (tumor site and size, angioinvasion, infiltration level, cell proliferation index, immunohistochemical phenotype, and metastases) [34, 35]. In addition, GEP-NETs were classified according to histopathology features as well-differentiated NETs (G1), well differentiated neuroendocrine carcinomas (G2) and poorly differentiated neuroendocrine carcinomas (G3) [5]. Cell proliferation activity was determined by count of Ki-67+ cells, as previously reported [34].

Patients were managed following available guidelines and recommendations [36]. Surgery was the first option of treatment in all cases, and, if residual disease was observed, adjuvant treatment with somatostatin analogs was prescribed. Patients were grouped into three categories according to their follow-up evaluation: 1) *complete remission*, if there was no evidence of tumor relapse/recurrence; 2) *stable disease*, in cases of residual but non-progressive tumor burden; and 3) *progressive disease*, if tumor growth or new lesions were detected. The Hospital's Ethics Committee approved the study, which was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and according to national and international guidelines. All patients signed a written informed consent before inclusion.

We obtained 72 formalin-fixed paraffin-embedded samples from primary and metastatic tissues from the 26 patients (Table 1). Of these, 30 samples corresponded to normal tissues (26 samples from adjacent non-tumoral regions and 4 normal control tissues obtained from patients that underwent intestinal, pancreatic or hepatic resection). The other 42 samples corresponded to tissues with pathological diagnosis of NET [26 from the primary site (pancreas or GIT) and 16 obtained from a metastatic site]. In order to ensure identification of representative and relevant areas of tumor and non-tumor tissues to carry out the RNA isolation of each sample, a comprehensive analysis of hematoxylin and eosin (H&E) sections was carried out by a pathologist. Simultaneously, immunohistochemical staining was

carried out in paraffin-embedded blocks by the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method, using an anti-human chromogranin A (CgA) antiserum (Biogenex Laboratories, San Ramon, CA USA), synaptophysin, and proliferation-related Ki-67 antigen (Dako Cytomation Denmark A/S, Copenhagen, Denmark); as well as glucagon, insulin, somatostatin and gastrin. Then, tumors were classified in accordance to current guidelines [5].

RNA isolation, reverse-transcription and quantitative real time PCR (qPCR)

Total RNA from formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) samples was isolated using the RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Limburg, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was also isolated from cultured NET cell lines (see below) using TRIzol Reagent (Life Technologies, Barcelona, Spain) following the manufacturer's protocol and subsequently treated with DNase (Promega, Barcelona, Spain). Quantification of the recovered RNA was assessed using NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA). One microgram of total RNA was retro-transcribed to cDNA with the First Strand Synthesis kit using random hexamer primers (Thermo Scientific). cDNAs were amplified with the Brilliant III SYBR Green Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using the Stratagene Mx3000p system and specific primers for each transcript of interest. Specifically, expression levels (absolute mRNA copy number/50ng of sample) of native ghrelin, In1-ghrelin, GOAT, GHSR1a, GHSR1b, Ki67, TP53 and Bcl2 were measured using previously validated primers (Supplemental Table 1 and/or [15, 37]) and methods [15, 38]. Briefly, samples derived from human NET tissues or NET cell lines were run, in the same plate, against a standard curve to estimate mRNA copy number ($1, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$, and 10^6 copies of synthetic cDNA template for each transcript) and a No-RT sample as a negative control. Thermal profile consisted of an initial step at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 20s) and annealing/elongation (60°C for 20s), and finally, a dissociation cycle (melting curve; 55°C to 95°C, increasing 0, 5°C/30 s) to verify that only one product was amplified. To control for variations in the amount of RNA used and the efficiency of the reverse-transcription reaction, the expression level (copy-number) of each transcript was adjusted by the expression of beta-actin (used as a control), as previously reported [39].

Cell cultures

We used two previously validated NET cell lines: carcinoid BON-1 cells [40] and somatostatinoma derived QGP-1 cells [41]. BON-1 cell line was cultured and maintained in Dulbecco's Modified Eagle

Medium (DMEM-F12; Life Technologies, Madrid, Spain) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 0.2% antibiotic (Gentamicin/Amphotericin B; Life Technologies). Meanwhile, QGP-1 was cultured and maintained in RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland), complemented with 10% FBS, 1% glutamine and 0.2% antibiotic. Both cell lines were maintained at 37°C and 5% CO₂, under sterile conditions.

Stable transfection of In1-ghrelin peptide

BON-1 and QGP-1 cell lines were stably transfected with pCDNA3.1 vector containing In1-ghrelin peptide (Life Technologies, Madrid, Spain) and selected as previously reported [42]. Specifically, NET cell lines were seeded in 6-well culture plates and transfected with In1-ghrelin or empty (mock) vectors using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies, Madrid, Spain) following manufacturer's instructions and selected from non-transfected cells by treatment with geneticin (Life Technologies, Madrid, Spain). Stable transfection of In1-ghrelin was always confirmed by qPCR.

Measurements of proliferation

As previously reported [39, 42], cell proliferation of cell lines transfected with In1-ghrelin or empty (mock) vectors was measured using the alamar-blue fluorescent assay (Life Technologies, Madrid, Spain). Briefly, transfected cells were seeded in 96-well plates at a density of 3000–5000 per well and serum-starved for 12 h. Then, after 3 h of incubation with 10% alamar-blue serum-free medium, basal proliferation rate was obtained by measuring the fluorescent signal exciting at 560 nm and reading at 590 nm using the FlexStation III system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Subsequently, proliferation rate was similarly measured at 24, 48 and 72 h after the basal proliferation rate evaluation. Medium was replaced by fresh medium containing FBS immediately after each measurement. Results were expressed as percentage referred to control (mock transfected cells). In all experiments, cells were seeded per quadruplicate and all experiments were performed a minimum of four times.

Measurements of migration capacity

The wound healing technique was used to assess the ability of mock and In1-ghrelin stably transfected NET cell lines to migrate, as previously reported [42]. Briefly, cell lines under confluence status and cultured in 6-well plates were serum-starved for 24 h to achieve cell synchronization, and then the wound was made using a 200 µl sterile pipette tip. Wells were rinsed using PBS and subsequently, cells were incubated for 24 h in FBS

supplemented medium. Wound healing was evaluated as the area of a rectangle centered in the picture 24 h after the wound vs. the area of the rectangle just after the wound was performed. To confirm the migration assay, at least three experiments were performed in independent days, in which three pictures randomly selected were acquired along the wound per well.

Measurements of serotonin secretion

Serotonin secretion was measured in mock and In1-ghrelin stably transfected NET cell lines using a specific commercially available ELISA kit (ALPCO, USA). Briefly, cell lines were seeded in 12-well plates at 70% confluence in serum-starved medium and 24 h later media were collected and stored at –20°C until measurements. Results are expressed as percentage of serotonin secretion of In1-ghrelin vs. mock-transfected cells. At least four experiments were performed in independent days, in which cells were plated per duplicate.

Statistical analyses and Receiver Operating Characteristic (ROC) curve of the expression of the ghrelin system in NET tissues

Descriptive results were expressed as mean ± standard deviation (SD), mean ± standard error of the mean (SEM), or median ± interquartile range, as appropriate. Quantitative variables were evaluated using Spearman's bivariate correlations and differences between groups were compared using analysis of variance (U-Mann Whitney or Kruskal-Wallis ANOVA). Comparison between related variables was performed using Wilcoxon sum rank test. Samples from all groups within an experiment were processed simultaneously. P-values were two-sided and statistical significance was considered when $P < 0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

As previously reported [43], ROC was performed for evaluation of diagnostic test sensibility and specificity. Specifically, in this study ROC was used as a tool to measure how well the expression of each of the components of the ghrelin system analyzed could distinguish between different diagnostic groups [clinical outcome of patients (tumor remission, stable disease or progressive disease) and malignancy features (expression in primary tumors of patients that developed metastasis compared to those that did not develop metastasis)]. Statistical analysis of ROC curves was performed by calculating the Area under the Curve (AUC) of each transcript and comparing them with the AUC of the reference line using Student's *t*-test.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has received the following grants: Proyectos de Investigación en Salud (FIS) PI13-01414, and PIE-0041 (funded by Instituto de Salud Carlos III) and S2011/BMD-2328 TIRONET (funded by Comunidad de Madrid) (to MM). BIO-0139, CTS-1406, PI-0639-2012 (funded by Junta de Andalucía), Proyectos de Investigación en Salud (FIS) PI13-00651 (funded by Instituto de Salud Carlos III), BFU2013-43282-R (funded by Ministerio de Economía y Competitividad), CIBERobn and Ayuda Merck Serono 2013 (to RML and JPC). Fellowship CTS-5051 (to AIC). “Sara Borrell” program CD11/00276 (to MDG). CIBER is an initiative of Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain.

CONFLICTS OF INTEREST

RML and JPC have received research grants from Ipsen and speaker’s fees from Novartis and Ipsen. MDC is an employee of Ipsen. MM has received speaker’s fees from Novartis and Ipsen. The rest of the authors have nothing to disclose.

REFERENCES

1. Taal BG, Visser O. Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology*. 2004; 1:3–7.
2. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35, 825 cases in the United States. *J Clin Oncol*. 2008; 26:3063–3072.
3. Hallet J, Law CH, Cukier M, Saskin R, Liu N, Singh S. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: A population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer*. 2015; 121:589–597.
4. Heitz P, Komminoth P, Perren A, Klimstra D, Dayal Y. 2004; Tumors of the endocrine pancreas. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumors of endocrine organs. Lyon: IARC Press:177–182.
5. Rindi G, Arnold R, Bosman FT, Capella C, Klimstra DS, Klöppel G. 2010; Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. WHO classification of tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press.
6. Hirabayashi K, Zamboni G, Nishi T, Tanaka A, Kajiwara H, Nakamura N. Histopathology of gastrointestinal neuroendocrine neoplasms. *Front Oncol*. 2013; 3:2.
7. Castaño JP, Sundin A, Maecke HR, Villabona C, Vazquez-Albertino R, Navarro E, Oberg K. Gastrointestinal neuroendocrine tumors (NETs): new diagnostic and therapeutic challenges. *Cancer metastasis reviews*. 2014; 33:353–359.
8. Oberg K, Casanovas O, Castaño JP, Chung D, Delle Fave G, Deneffe P, Harris P, Khan MS, Kulke MH, Scarpa A, Tang LH, Wiedenmann B. Molecular pathogenesis of neuroendocrine tumors: implications for current and future therapeutic approaches. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:2842–2849.
9. Gahete MD, Rincon-Fernandez D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibanez-Costa A, Martinez-Fuentes AJ, Gracia-Navarro F, Castano JP, Luque RM. Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. *J Endocrinol*. 2014; 220:R1–R24.
10. Chopin LK, Seim I, Walpole CM, Herington AC. The ghrelin axis—does it have an appetite for cancer progression? *Endocrine reviews*. 2012; 33:849–891.
11. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402:656–660.
12. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:6320–6325.
13. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008; 132:387–396.
14. Seim I, Herington AC, Chopin LK. New insights into the molecular complexity of the ghrelin gene locus. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009; 20:297–304.
15. Gahete MD, Cordoba-Chacon J, Hergueta-Redondo M, Martinez-Fuentes AJ, Kineman RD, Moreno-Bueno G, Luque RM, Castaño JP. A novel human ghrelin variant (In1-ghrelin) and ghrelin-O-acyltransferase are overexpressed in breast cancer: potential pathophysiological relevance. *PloS one*. 2011; 6:e23302.
16. Chanclon B, Luque RM, Cordoba-Chacon J, Gahete MD, Pozo-Salas AI, Castano JP, Gracia-Navarro F, Martinez-Fuentes AJ. Role of endogenous cortistatin in the regulation of ghrelin system expression at pancreatic level under normal and obese conditions. *PloS one*. 2013; 8:e57834.
17. Camiña JP. Cell biology of the ghrelin receptor. *J Neuroendocrinol*. 2006; 18:65–76.
18. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; 86:881–887.
19. Papotti M, Duregon E, Volante M. Ghrelin and tumors. *Endocr Dev*. 2013; 25:122–134.

20. Barbieri F, Albertelli M, Grillo F, Mohamed A, Saveanu A, Barlier A, Ferone D, Florio T. Neuroendocrine tumors: insights into innovative therapeutic options and rational development of targeted therapies. *Drug Discov Today*. 2014; 19:458–468.
21. Ibáñez-Costa A, Gahete MD, Rivero-Cortés E, Rincón-Fernández D, Nelson R, Beltran M, de la Riva A, Japon MA, Venegas-Moreno E, Galvez MA, Garcia-Arnes JA, Soto-Moreno A, Morgan J, Tsomaia N, Culler MD, Dieguez C, et al. In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features. *Sci Rep*. 2015; 5:8714.
22. Vu JP, Wang HS, Germano PM, Pisegna JR. Ghrelin in neuroendocrine tumors. *Peptides*. 2011; 32:2340–2347.
23. Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:5052–5059.
24. Rindi G, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, Cocchi D, Paolotti D, Solcia E. Ghrelin expression in gut endocrine growths. *Histochem Cell Biol*. 2002; 117:521–525.
25. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:1300–1308.
26. Inhoff T, Monnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wissner AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Tache Y, Kobelt P. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides*. 2008; 29:2159–2168.
27. Ekeblad S, Lejonklou MH, Grimfjard P, Johansson T, Eriksson B, Grimelius L, Stridsberg M, Stalberg P, Skogseid B. Co-expression of ghrelin and its receptor in pancreatic endocrine tumours. *Clinical endocrinology*. 2007; 66:115–122.
28. Cassoni P, Allia E, Marrocco T, Ghe C, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and *in vitro* effect on the H345 small cell carcinoma cell line. *J Endocrinol Invest*. 2006; 29:781–790.
29. Seim I, Jeffery PL, de Amorim L, Walpole CM, Fung J, Whiteside EJ, Lourie R, Herington AC, Chopin LK. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is expressed in prostate cancer tissues and cell lines and expression is differentially regulated *in vitro* by ghrelin. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013; 11:70.
30. Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol*. 2004; 150:173–184.
31. Chow KB, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CH, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 348:247–254.
32. Leung PK, Chow KB, Lau PN, Chu KM, Chan CB, Cheng CH, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cellular signalling*. 2007; 19:1011–1022.
33. Kim E, Goren A, Ast G. Insights into the connection between cancer and alternative splicing. *Trends in genetics: TIG*. 2008; 24:7–10.
34. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*. 2006; 449:395–401.
35. Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch*. 2007; 451:757–762.
36. Garcia-Carbonero R. 2013; Manual de diagnóstico y tratamiento de los tumores neuroendocrinos de origen digestivo: Grupo Español de Tumores Neuroendocrinos (GETNE).
37. Barbarroja N, Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Castro-Villegas C, Aguirre MA, Carretero R, Segui P, Jimenez-Gomez Y, Sanna M, Rodriguez-Ariza A, Collantes-Estevez E, Escudero A, Lopez-Pedraza C. Anticyclic citrullinated protein antibodies are implicated in the development of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2014; 34:2706–2716.
38. Gahete MD, Rubio A, Cordoba-Chacon J, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Avila J, Luque RM, Castaño JP. Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*. 2010; 22:819–828.
39. Luque RM, Ibanez-Costa A, Lopez-Sanchez LM, Jimenez-Reina L, Venegas-Moreno E, Galvez MA, Villa-Osaba A, Madrazo-Atutxa AM, Japon MA, de la Riva A, Cano DA, Benito-Lopez P, Soto-Moreno A, Gahete MD, Leal-Cerro A, Castano JP. A Cellular and Molecular Basis for the Selective Desmopressin-Induced ACTH Release in Cushing Disease Patients: Key Role of AVPR1b Receptor and Potential Therapeutic Implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98:4160–4169.
40. Evers BM, Townsend CM Jr, Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC.

Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*. 1991; 101:303–311.

41. Iguchi H, Hayashi I, Kono A. A somatostatin-secreting cell line established from a human pancreatic islet cell carcinoma (somatostatinoma): release experiment and immunohistochemical study. *Cancer research*. 1990; 50:3691–3693.
42. Duran-Prado M, Gahete MD, Hergueta-Redondo M, Martínez-Fuentes AJ, Córdoba-Chacón J, Palacios J, Gracia-Navarro F, Moreno-Bueno G, Malagón MM,

Luque RM, Castano JP. The new truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells. *Oncogene*. 2012; 31:2049–2061.

43. Puig-Domingo M, Luque RM, Reverter JL, López-Sánchez LM, Gahete MD, Culler MD, Díaz-Soto G, Lomena F, Squarcia M, Mate JL, Mora M, Fernández-Cruz L, Vidal O, Alastrue A, Balibrea J, Halperin I, et al. The Truncated Isoform of Somatostatin Receptor5 (sst5TMD4) Is Associated with Poorly Differentiated Thyroid Cancer. *PLoS One*. 2014; 9:e85527.